

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**INTERAÇÃO ENTRE MATRIZES UTILIZADAS EM SISTEMAS DE
PURIFICAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS E BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

Sandra Cesteiro Lima da Silva

Dissertação orientada pela Professora Doutora Aida Duarte e, coorientada
pela Professora Doutora Ana Paula Carvalho.

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2017

Agradecimentos

Ao concluir este trabalho, não podia deixar de expressar a minha gratidão a todos aqueles que, de uma ou outra forma, contribuíram para a sua elaboração:

À Prof.^a Dr.^a Aida Duarte, pela amizade, orientação interesse demonstrados. Fica aqui a minha admiração, consideração e respeito.

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula Carvalho, pela orientação deste trabalho, pela disponibilidade e incentivo.

À Dr.^a Luísa Jordão do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge pela incansável ajuda e pelo fornecimento de informação importante para este trabalho.

À Stephanie Albino, colega de laboratório, pela amizade e apoio demonstrados.

Aos amigos, pela disponibilidade, apoio, ajuda e companheirismo no decorrer do estudo.

À minha família, em especial à minha mãe e irmão, pelo apoio, compreensão e confiança sempre presentes ao longo da minha vida.

Resumo

A emergência de bactérias multirresistentes está a ocorrer um pouco por todo o mundo sendo as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) a principal fonte desses microrganismos. Para remover essas bactérias, o carvão ativado e o *biochar* são possíveis tecnologias que, devido às suas propriedades ajustáveis, podem ser adsorventes adequados para diferentes tipos de microrganismos, por exemplo, bactérias Gram positivo ou Gram negativo. O objetivo deste estudo foi testar dois materiais diferentes, o carvão ativado (CC) comercializado para fins de tratamento de água e um *biochar* produzido em laboratório (CS), para reduzir o conteúdo de bactérias comumente detetadas em águas residuais.

Os ensaios foram realizados utilizando o carvão CC em duas granulometrias diferentes e o *biochar* CS apenas numa granulometria contra diferentes estirpes bacterianas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) e em águas residuais.

No geral, as todas as estirpes bacterianas utilizadas apresentaram bons resultados na adsorção à superfície dos diferentes materiais utilizados. No entanto, no ensaio com as águas residuais foi verificada menor remoção de bactérias.

Palavras-chave: Carvão ativado, *biochar*, adsorção, biofilmes, bactérias multirresistentes

Abstract

The rapid emergence of multi-resistant bacteria is occurring worldwide being wastewater treatment plants a major source of these microorganisms. To remove these bacteria possible strategies are those involving carbon materials that due to their tunable properties can be suitable adsorbents for different types of microorganisms, for example Gram + or Gram – bacteria. The objective of this study was to test two different carbon materials an activated carbon (CC) commercialized for water treatment purpose and a lab made *biochar* (CS) to reduce the content of bacteria commonly detected in wastewater.

The assays were made using the carbon CC in two different granulometries and the *biochar* CS in one granulometry against different strains (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) and on wastewater.

In general, all bacterial strains presented good results of adsorption of bacteria with the different carbon materials. However, it was verified a lower bacteria removal efficiency in the assay with wastewater.

Key words: Activated carbon, *biochar*, adsorption, biofilms, multi-resistant bacteria

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	1
1. Introdução	3
1.1. Carvão Ativado e <i>Biochar</i>	4
1.1.1. Preparação do Carvão Ativado	5
1.1.2. Preparação do <i>biochar</i>	6
1.1.3. Interação entre matrizes de carvão e bactérias	8
1.2. Águas residuais	10
1.3.1. Bactérias Multirresistentes	16
1.3.2. Formação de Biofilmes e Resistência a Antibióticos	19
1.4. Objetivos	20
CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS	21
2. Materiais e Métodos	23
2.1. Matrizes	23
2.1.1. Preparação das Matrizes	23
2.1.1.1. Carvão CC	23
2.1.1.2. <i>Biochar</i> CS	23
2.3. Ensaio de Adsorção	26
2.3.1. Interação entre as Matrizes e as Estirpes Bacterianas	26
2.3.2. Interação entre as Matrizes e as Águas Residuais	27
2.4. Cura de Plasmídeos	27
2.5.1. Detecção de Biofilmes nas paredes dos tubos	28
2.5.2. Detecção de Biofilmes nas Matrizes	28

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3. Resultados e Discussão	32
3.1. Matrizes	32
3.1.1. Carvão CC	32
3.1.2. <i>Biochar</i> CS	32
3.2. Ensaio de Interação entre as Matrizes e as Estirpes Bacterianas	34
3.2.1. <i>E. coli</i> ATCC 25922	35
3.2.2. <i>S. aureus</i> ATCC 700699	36
3.2.3. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 23708	39
3.3.4. <i>K. pneumoniae</i>	41
3.3. Cura de Plasmídeos	48
3.4. Ensaio de Interação entre as Matrizes e as Águas Residuais	54
3.5. Ensaio de Detecção da Formação de Biofilmes	57
3.5.1. Formação de Biofilmes nas Paredes dos Tubos	57
3.5.2. Formação de Biofilmes nas Matrizes	60
 CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	 63
4. Conclusão e Perspetivas Futuras	65
 CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFIA	 67
5. Bibliografia	69
 ANEXOS	 77
ANEXO 1. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.2.	79
ANEXO 2. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.3.	85
ANEXO 3. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.4.	87
ANEXO 4. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.5.1.	88

Índice de Figuras

Figura 1 Microfotografia de carvão ativado (Norit SAE super, comercializado pela empresa Norit – Cabot)) em microscópio eletrônico, ampliação 1000x	5
Figura 2 Principais etapas do tratamento de águas residuais, esquema adaptado do site das Águas de Portugal. ²⁵ 1. Pré-tratamento, 2. Tratamento primário, 3. Tratamento secundário, 4. Tratamento terciário, 5. Descarga do efluente tratado.	11
Figura 3 Microfotografia do carvão CC <0,074mm, ampliação 500x.	32
Figura 4 Microfotografia do CS, ampliação 500x.	33
Figura 5 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano.	35
Figura 6 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	36
Figura 7 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	36
Figura 8 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC ≤0,149 mm em 5 mL de inóculo de <i>E. coli</i> ATCC 25922.	36
Figura 9 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de <i>S.aureus</i> ATCC 700699.	38
Figura 10 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074mm em 5 mL de inóculo de <i>S. aureus</i> ATCC 700699.	38
Figura 11 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC ≤0,149mm em 5 mL de inóculo de <i>S. aureus</i> ATCC 700699.	38
Figura 12 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 23708.	40
Figura 13 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 23708.	40
Figura 14 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC ≤0,149 mm em 5 mL de inóculo de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 23708.	39
Figura 15 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de <i>K. pneumoniae</i> 4889.	41
Figura 16 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) <i>versus</i> tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de <i>K. pneumoniae</i> 4889.	41

- Figura 17** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 4889. 42
- Figura 18** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 45. 42
- Figura 19** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $< 0,074$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 45. 42
- Figura 20** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 45. 42
- Figura 21** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 703. 43
- Figura 22** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de Carvão CC $< 0,074$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 703. 43
- Figura 23** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 703. 43
- Figura 24** Percentagens remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CS. 44
- Figura 25** Percentagens de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC $< 0,074$ mm. 44
- Figura 26** Percentagens de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm. 44
- Figura 27** Antibiograma da bactéria *K. pneumoniae* 2948 A) Antes da cura de plasmídeos e B) Depois da cura de plasmídeos, usando discos dos antibióticos amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoxitina (FOX), ciprofloxacina (CIP), imipenemo (IMP) e gentamicina (GM). 49
- Figura 28** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 R. 49
- Figura 29** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $< 0,074$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 R. 49
- Figura 30** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $< 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 R. 50
- Figura 31** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 S. 50

- Figura 32** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 S. 50
- Figura 33** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC ≤0,149 mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 S. 50
- Figura 34** Percentagens de remoção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos no ensaio de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CS. 52
- Figura 35** Percentagens de remoção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos no ensaio de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC <0,074mm. 52
- Figura 36** Percentagens de remoção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos no ensaio de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC ≤0,149mm. 53
- Figura 37** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL da Água de ETAR. 55
- Figura 38** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074mm em 5 mL da Água de ETAR 55
- Figura 39** Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC ≤0,149 mm em 5 mL da Água de ETAR. 55
- Figura 40** Percentagens de eficiência de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra. 56
- Figura 41** Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 703. 58
- Figura 42** Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 2948 R. 58
- Figura 43** Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 2948 S. 58
- Figura 44** Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *P. aeruginosa* ATCC 23708. 59
- Figura 45** Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 45. 59
- Figura 46** Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 4889. 59
- Figura 47** Microfotografia SEM da *K. pneumoniae* 2948 R adsorvida em duas matrizes, ampliação x2000. 61
- Figura 48** Microfotografia SEM da *P. aeruginosa* ATCC 23708 adsorvida em duas matrizes. A - ampliação x5000, B - ampliação x2000. 61

Figura 49 Microfotografia SEM da *K. pneumoniae* 703 adsorvida duas matrizes, com ampliação x2000. 62

Índice de Tabelas

Tabela 1. Quantificação das bactérias em meio de cultura sólido, no início (0min.) e no final (90min.) do ensaio de adsorção com as diferentes amostras. Os resultados estão apresentados em UFC/mL.	40
Tabela 2. Suscetibilidade a antibióticos da <i>K. pneumoniae</i> 2948 antes e depois da cura de plasmídeos.	41
Tabela 3. Quantificação das bactérias em meio de cultura sólido, no início (0min.) e no final (90min.) do ensaio de adsorção com as diferentes amostras. Os resultados estão apresentados em UFC/mL.	46
Tabela 4. Quantificação das bactérias presentes na água residual em meio de cultura sólido, no início (0min.) e no final (90min.) do ensaio de adsorção com as diferentes amostras. Os resultados estão apresentados em UFC/mL	49

Lista de Abreviaturas

ADE – Água destilada estéril

AMC – Amoxicilina/Ácido Clavulânico

CAZ – Ceftazidima

CC – Carvão ativado comercial

CIP – Ciprofloxacina

CS – Carvão produzido em laboratório, a partir de serradura de pinheiro

CTX – Cefotaxima

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais.

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FOX – Cefoxitina

GM – Gentamicina

IMP – Imipenem

LPS – Lipopolissacárido

MHA – *Müller – Hinton agar*

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

pH_{pzc} – pH at the point of zero charge

SEM – *Scanning electron microscopic*

TSB – *Tryptic soy broth*

UFC – Unidade formadora de colónias

UV – Ultravioleta

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da preocupação com os recursos naturais renováveis e não renováveis.

De todos os recursos naturais, a água é um dos mais importantes e a sua disponibilidade é basilar para todos os seres vivos, bem como para a agricultura e todas as indústrias. Por outro lado, é um recurso limitado sendo cada vez mais incontestável a sua importância enquanto componente fundamental do ecossistema global.

A poluição biológica da água tem sido uma preocupação para toda a população em geral, e a para a comunidade científica em particular, a qual tem vindo a investigar novas formas de combater esta questão.

A deteção de bactérias multirresistentes a antibióticos começou por ser um problema apenas localizado no meio hospitalar, no entanto, tornou-se um problema de saúde pública pois afeta transversalmente toda a sociedade¹⁻⁴. Subjacente à presença de bactérias multirresistentes há ainda a possibilidade de existirem determinantes de resistência aos antibióticos⁵ que, devido ao próprio ciclo de vida das bactérias, isto é, em consequência da lise, podem permanecer no meio ambiente por curtos períodos. O aparecimento de determinantes de resistência a antibióticos resulta de processos naturais de transferência de DNA entre espécies bacterianas, tais como, a transformação natural – entrada do DNA livre através da membrana celular, e transdução – entrada do DNA integrado no cromossoma de um bacteriófago.

Para diminuir ou mesmo anular os contaminantes presentes em vários tipos de água pode recorrer-se a diversos processos, sendo uma das possibilidades o uso de tecnologias baseadas na adsorção em carvões ativados. De facto, a aplicação deste tipo de materiais como um meio de adsorção de compostos poluentes em águas para consumo humano⁶⁻⁸, tem sido vastamente descrito na literatura. Contudo, no campo das águas residuais a utilização do carvão ativado para remoção de bactérias ainda é uma hipótese vagamente estudada⁹.

Considerando a importância dos recursos hídricos torna-se cada vez mais importante a consciencialização sobre a melhor forma de tratamento da água como sustento da vida no planeta, a hipótese proposta para a realização deste projeto consistiu em avaliar possibilidade de bactérias multirresistentes serem adsorvidas a uma superfície abiótica, como é o caso de uma matriz de carvão ativado ou *biochar*.

1.1. Carvão Ativado e *Biochar*

O carvão ativado é um material poroso que apresenta uma alta capacidade de adsorção, sendo por isso muito utilizado no tratamento de águas para consumo humano para remover compostos orgânicos indesejáveis.

A designação *biochar* refere-se a materiais à base de carbono que pode ser produzido através de pirólise, não tendo por isso porosidade desenvolvida. Este tipo de materiais tem sido muito utilizado em agricultura, para correção das características dos solos¹⁰ e para a produção de combustíveis mais sustentáveis. No entanto, o seu desempenho no tratamento de águas residuais não está muito estudado, havendo, contudo, referências na literatura que mostram o potencial do biochar como um substituto do carvão ativado para a remoção de compostos orgânicos¹¹. A título de exemplo pode referir-se o estudo desenvolvido por Mui *et al.* onde se demonstrou que o biochar produzido a partir de bambu permitiu a remoção de mais de 0,99 mmol/g de azul de metileno¹².

Para produzir estes dois tipos de materiais de carbono, podem ser usados diferentes tipos de precursores, como por exemplo, madeira, casca de coco, caroços de fruta ou mesmo carvão mineral. Um bom material precursor é aquele que possui um elevado teor de carbono na sua composição e que estar disponível em grandes quantidades e a um custo muito reduzido dado que o processo de preparação destes materiais tem um rendimento relativamente baixo¹³.

1.1.1. Preparação do Carvão Ativado

O carvão ativado apresenta uma estrutura composta por um arranjo aleatório de folhas gráficas e numa fase não organizada, o que origina uma estrutura porosa muito desenvolvida (área superficial usualmente $\sim 1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) mas podendo atingir valores muito mais elevados, isto é, da ordem dos $2500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ¹⁴. São materiais anfotéricos por natureza, ou seja, têm centros ácidos e básicos que coexistem na sua superfície ¹³.

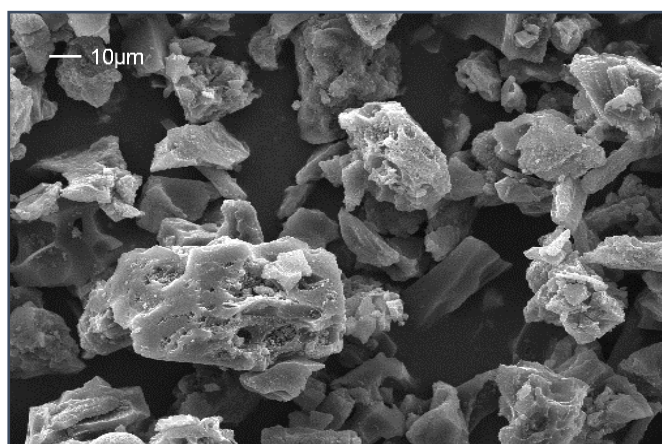


Figura 1 Microfotografia de carvão ativado (Norit SAE super, comercializado pela empresa Norit – Cabot) em microscópio eletrónico, ampliação 1000x.

O carvão ativado é produzido a partir da desidratação de matérias-primas e carbonização seguida de ativação. As suas características são influenciadas, sobretudo, pelo material precursor e pelo método utilizado na sua ativação ¹³.

Os métodos de ativação mais utilizados são, a ativação física e ativação química. A ativação física consiste em tratamentos térmicos, a temperaturas relativamente elevadas, numa atmosfera de vapor de água ou CO_2 usando habitualmente N_2 como gás de arraste. Os tratamentos são normalmente realizados por períodos longos. Na ativação química o material é impregnado num agente químico (ex: ZnCl_2 , H_3PO_4 , KOH) para, na etapa de pirólise, promover a ativação do material precursor ¹³. No final, é necessário lavar o material obtido de forma a remover os produtos de reação que permaneceram no interior das partículas carbonizadas, desobstruindo-se assim os microporos formados durante a ativação.

O carvão ativado pode ser obtido em diferentes formas físicas, entre as quais se pode referir pó e granulado. O carvão na forma de pó é utilizado como adsorvente em processos de descontaminação em meio aquoso para a remoção de cor, cheiro e outras impurezas⁹. O carvão granulado é utilizado para a purificação de efluentes gasosos^{9-11,13}.

O controlo da granulometria no final da produção do carvão ativado pode ser feito através de moagem, aglomeração ou por simples peneiração.

1.1.2. Preparação do *biochar*

O *biochar* é preparado a partir de uma biomassa que, tal como na preparação do carvão ativado, é sujeita, a uma carbonização. Durante esta etapa, são removidos outros elementos para além do carbono e a matéria prima é transformada num material rico em carbono. O produto desta carbonização – *biochar* – pode, posteriormente, ser utilizado como precursor de carvão ativado de forma a desenvolver uma rede de poros.

As propriedades do *biochar* são diferentes das do carvão ativado, embora ambos sejam materiais ricos em carbono, uma vez que o *biochar* é um produto não totalmente carbonizado, porque a sua produção através da pirólise é, frequentemente, realizada a temperaturas mais baixas (<500°C) quando comparadas com o processo de produção do carvão ativado^{13,15}

Para além dos métodos convencionais (Pirólise) para a preparação de materiais ricos em carbono, existem também métodos alternativos como, a carbonização hidrotérmica e a carbonização mediada por ácido.

A carbonização hidrotérmica é uma metodologia que converte biomassa em materiais ricos em carbono de forma ecológica e a baixo custo. Neste processo, é utilizada água com solvente, temperaturas amenas, pressão auto gerada e ocorre em poucas horas sem a emissão de CO₂.

A carbonização mediada por ácido é um método alternativo para obter um material rico em carbono pouco explorado até agora. Contudo, a catálise ácida é uma

prática comum para a extração de açúcares a partir de uma biomassa lenhinocelulósica¹⁶. Esta metodologia, ocorre à pressão atmosférica e em alguns casos a baixas temperaturas ($\approx 100^{\circ}\text{C}$) o que permite o processamento de materiais precursores de carvão que não reúnem as propriedades adequadas para serem carbonizados pelo método convencional ou por carbonização hidrotérmica.

Nos estudos de Wang *et al.*, mostrou-se que a carbonização mediada por ácido é capaz de maximizar a disponibilidade de celulose e hemicelulose em precursores de carbono com alto conteúdo inorgânico, como por exemplo, casca de arroz^{17, 18}.

1.1.3. Interação entre matrizes de carvão e bactérias

O uso de carvões para purificação de águas residuais é uma temática pouco abordada na literatura⁹, no entanto já existem alguns estudos onde este método é implementado para a remoção de bactérias em águas de consumo humano como por exemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Raoultella terrigena*^{6-9,19}.

A adsorção na superfície do carvão acontece através de interações físicas (forças dispersivas e electroestáticas) ou através ligações químicas. Neste sentido, a capacidade de adsorção dos carvões ativados pode ser otimizada através de modificação das propriedades químicas da superfície para potenciar um dado tipo de interação.

Ao escolher um carvão ativado ou *biochar* para realizar um estudo de adsorção é, pois, importante ter em conta as características tanto do adsorvente – carvão, como do adsorvato – neste projeto, as bactérias.

Segundo Bos *et al.* e Jucker *et al.* em geral, os microrganismos ligam-se à superfície do carvão através de fortes ligações de van der Waals, superando assim a repulsão eletrostática entre as células e superfícies de carvão, negativamente carregadas

20,

21,

Ambientes de baixa força iónica, como por exemplo em sistemas de água potável, oferecem condições para melhorar a eficácia dos carvões para remoção dos microrganismos da água por modificação de carga das superfícies do carvão ²⁰⁻²². Uma vez carregado positivamente, a atração eletrostática entre a superfície da célula microbiana carregada negativamente as partículas de carvão modificadas positivamente serão muito fortes ²⁰. A estabilidade das superfícies carregadas positivamente é geralmente baixa, no entanto, e em muitos ambientes naturais, a adsorção de macromoléculas e a adsorção de contra iões carregados negativamente neutralizam rapidamente a carga positiva criada numa superfície²². Assim, torna-se mais fácil adsorção de bactérias à superfície dos carvões.

É importante referir também que as bactérias possuem estruturas diferentes, podendo ser divididas em dois grandes grupos, as Gram negativo e as Gram positivo. As bactérias Gram negativo para além do peptidoglicano possuem uma camada externa que é essencialmente constituída por lipopolissacárido (LPS). As bactérias Gram positivo são constituídas por uma camada de peptidoglicano mais espessa do que nas Gram negativo, além disso contém ácidos teicóicos ligados covalentemente ao peptidoglicano. Os ácidos teicóicos são polímeros de polióis fosfatados com carga negativa muito forte o que confere às bactérias Gram positivo uma carga negativa maior do que as bactérias Gram negativo ²³. Esta diferença das cargas nos dois grupos de bactérias poderá influenciar a sua afinidade para a superfície das partículas de carvão.

1.2. Águas residuais

O número de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) ao serviço das populações teve um aumento nas últimas décadas, o que levou à necessidade de implementar normas para que as águas tratadas – efluente – apresentassem características físico-químicas e biológicas que permitissem a sua reposição no meio ambiente sem comprometer o ecossistema e a saúde pública^{24,25}.

As águas residuais que chegam às ETARs são de diferentes origens e, de acordo com a sua proveniência, podem ser divididas em três categorias: águas domésticas, águas industriais e águas pluviais, correspondendo a diferentes níveis de poluição com cargas elevadas de poluentes e de microrganismos. Sendo assim, o saneamento de águas residuais tornou-se um problema de extrema importância para a sociedade em geral, com o intuito de reduzir ao mínimo a poluição dos rios, dos lagos, dos lençóis freáticos e de todas as restantes linhas de água.

A principal função do saneamento é preservar a qualidade de vida e o meio ambiente, desempenhando igualmente um papel importante na proteção sanitária da sociedade. A recolha, transporte e tratamento adequados das águas residuais evitam que os rios se transformem em esgotos e consequentemente em focos potencialmente disseminadores de doenças. Além disso, contribui também para preservação da qualidade do ambiente e das atividades ligadas à água (turismo, piscicultura, agricultura e indústria).

As águas residuais são sujeitas a diferentes tipos de tratamento primário, secundário e terciário, de acordo com o destino que terá a água tratada (Figura 2).

Os afluentes são sujeitos aos processos de separação dos sólidos mais grosseiros – Pré-tratamento – tais como a gradagem, o desarenamento nas caixas de areia e o desengorduramento nas chamadas caixas de gordura ou em pré-decantadores. Nesta fase, a água residual pode ser sujeita a um pré-arejamento e a uma equalização tanto de caudais como de cargas poluentes^{24,25}.

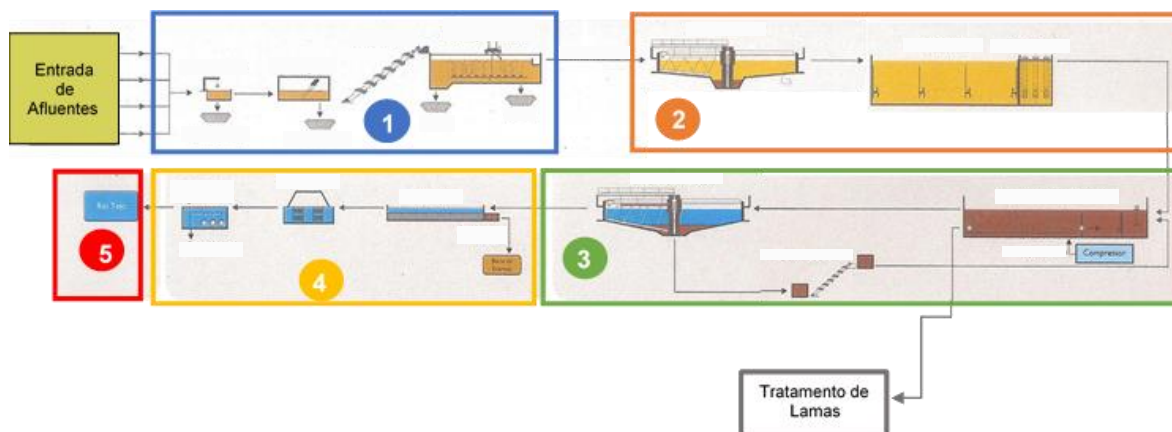


Figura 2 Principais etapas do tratamento de águas residuais, esquema adaptado do site das Águas de Portugal.²⁵ 1. Pré-tratamento, 2. Tratamento primário, 3. Tratamento secundário, 4. Tratamento terciário, 5. Descarga do efluente tratado.

No tratamento primário, a matéria poluente é separada da água por sedimentação nos decantadores primários. Este processo pode, em alguns casos, ser ajudado pela adição de agentes químicos que através de uma coagulação/floculação possibilitam a obtenção de flocos de matéria poluente de maiores dimensões e assim mais facilmente decantáveis^{25,26}.

O tratamento secundário é efetuado através de um processo biológico onde a matéria orgânica é consumida por microrganismos aeróbios nos reatores biológicos. A água saída do reator biológico contém uma grande quantidade de microrganismos, que sofrem posteriormente um processo de sedimentação nos decantadores secundários^{25,26}.

No tratamento terciário são submetidas a uma desinfecção e remoção de nutrientes. Normalmente é necessário proceder à desinfecção das águas para a remoção dos organismos patogénicos ou, em casos especiais, à remoção de determinados nutrientes, como o nitrogénio e o fósforo, que podem potenciar a eutrofização das águas recetoras^{25,26}. A desinfecção é, usualmente, feita através de radiação ultravioleta (UV), em que ao longo do canal estão instaladas lâmpadas UV

que funcionam de forma automática. Por norma este sistema é bastante eficiente na
remoção de

microrganismos, mas a sua eficiência pode variar com o nível de caudal e a qualidade da água^{24,25,27}. Após o tratamento na ETAR, parte da água é reutilizada para regas e lavagens e a restante é devolvida à natureza, permitindo assegurar a reposição de água nos meios hídricos sem comprometer a saúde pública e os ecossistemas, protegendo a natureza e a biodiversidade. Contudo, estas águas têm registado um nível elevado de carga microbiana, que não foi removida eficazmente durante o tratamento.

Os estabelecimentos de saúde são uma das maiores fontes de disseminação de bactérias patogénicas e, no entanto, a maior parte dos estabelecimentos de saúde não dispõe, ou não estão em funcionamento, sistemas de tratamento preliminar para as águas residuais²⁸. A falta destes sistemas de tratamento preliminar poderá levar a uma sobrecarga de bactérias nas ETARs fazendo com que o tratamento das águas residuais não seja tão eficaz o que leva à descarga destas bactérias no meio ambiente. Tudo isto faz com que seja de extrema importância encontrar formas de diminuir a carga de poluentes e de microrganismos presentes nas águas residuais²⁹⁻³¹.

1.3. Bactérias, Antibióticos e o Meio Ambiente

A descoberta dos antibióticos é considerada um dos feitos científicos mais importantes do século XX, o seu desenvolvimento e uso em medicina veterinária e humana levou a uma redução significativa da mortalidade e morbilidade³¹. Contudo, o uso indiscriminado e leviano dos antibióticos, tanto em humanos como em animais, fez com que os antibióticos fossem reconhecidos como uma nova classe emergente de contaminantes ambientais^{5, 32}.

Os antibióticos têm a capacidade de impedir a multiplicação de bactérias, interferindo na síntese proteica, ou de as destruir, sem apresentar efeitos tóxicos para as células humanas. São conhecidos vários mecanismos de ação antimicrobiana: os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos) inibem a

síntese de peptidoglicano da parede celular; os aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrólidos ligam-se às subunidades ribossomais inibindo a síntese proteica; as

quinolonas impedem a replicação do DNA por interação com a DNA girase ou a topoisomerase IV; e as sulfonamidas inibem a síntese de folato, que é essencial na formação de purinas e alguns aminoácidos²³.

As bactérias Gram negativo, *Pseudomonas aeruginosa* e as bactérias que pertencem à família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp para além de serem comensais dos humanos e animais, são bactérias ambientais, são também as principais responsáveis por infeções bacterianas em meio hospitalar. As bactérias Gram positivo, o *Staphylococcus aureus* é o principal responsável por infeções hospitalares.

As bactérias desenvolveram vários mecanismos de forma a inibir a ação dos antibióticos. Os genes que codificam estes mecanismos de defesa estão localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos extracromossómicos e são transmitidos para a geração seguinte (transferência vertical de genes)³³⁻³⁵. A aquisição de genes exógenos por mecanismos de transformação, transdução ou conjugação, associados a estruturas de DNA móveis como transposões, plasmídeos e integrões, facilita a sua propagação entre espécies e géneros bacterianos (transferência horizontal de genes)³³. A transferência horizontal de genes por conjugação é comum na natureza onde a densidade de bactérias é alta e, portanto, mais facilmente duas células bacterianas ficam próximas uma da outra^{34, 35}.

A resistência aos antibióticos tem sido o foco de pesquisa principalmente em contextos clínicos (medicina humana e veterinária), apenas recentemente foi considerado, o impacto do meio ambiente como reservatório de fatores de resistência e da libertação de bactérias resistentes a antibióticos no meio ambiente. Contudo, é sabido que as bactérias resistentes aos antibióticos e os genes de resistência a antibióticos são ubíquos na natureza³⁸⁻⁴¹ e podem ocorrer em altas concentrações em águas residuais clínicas, industriais e comunitárias³⁹⁻⁴¹, bem como nas provenientes das explorações de criação de animais⁴²⁻⁴⁴. Como tal, as ETARs são consideradas um dos pontos críticos para a propagação de resistência aos

antibióticos^{5,45,46}. Esta ideia é sustentada por vários argumentos. O primeiro é que, os resíduos de antibióticos e outros medicamentos, substâncias com potencial de pressão seletiva, bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistência são descarregados abundantemente no sistema de esgoto municipal⁴⁶⁻⁵⁰. O segundo é que durante o processo de tratamento das águas residuais, as condições oferecidas aos microrganismos podem favorecer a seleção ou a transferência horizontal de genes de determinantes de resistência antibiótica⁷. Por último, a nível mundial, é observável que o tratamento de águas residuais, independentemente da sua eficiência ou das condições operacionais, conduz à produção de efluentes finais contendo bactérias resistentes aos antibióticos, muitas vezes em percentagens superiores à do afluente^{4,46}.

A dinâmica das diferentes estirpes bacterianas que prosperam nos sistemas de águas residuais pode ser influenciada por inúmeras variáveis bióticas e abióticas que variam durante o tratamento de águas residuais⁴. A este nível, as pressões seletivas, exercidas por resíduos de antibióticos e metais pesados, mesmo em baixas concentrações, podem ser muito importantes^{5,32}. No entanto, o conhecimento nessa área é ainda diminuto. Embora, na literatura o potencial de pressão seletiva nas águas residuais seja assumido frequentemente, é difícil obter evidências experimentais⁴. Não obstante, segundo Tello *et al.* mesmo baixas concentrações de antibiótico podem exercer um efeito de pressão seletiva⁵¹.

1.3.1. Bactérias Multirresistentes

A introdução contínua de bactérias resistentes a antibióticos e os seus genes de resistência, levanta duas preocupações fundamentais. A disseminação e persistência de bactérias resistentes a antibióticos em meio ambiente aquático podem contribuir para o aumento das infeções com agentes patogénicos resistentes e, em segundo lugar, pode levar a um aumento de genes de resistência a antibióticos em bactérias ambientais, facilitando assim a transferência de resistência para agentes

patogénicos atuais e emergentes. As bactérias multirresistentes surgiram, principalmente em

hospitais e outros ambientes onde grandes quantidades de antibióticos são frequentemente utilizadas^{52,53}.

As bactérias multirresistentes são bactérias que possuem vários mecanismos de resistência em simultâneo, o que lhes confere a capacidade de serem resistentes a diferentes famílias de antibióticos, como: β – lactâmicos, aminoglicósidos, quinolonas, trimetoprim-sulfametaxazol²³.

Uma das bactérias multirresistentes com maior relevância é o *S.aureus* resistente à metilina (MRSA). Apesar de esta estirpe ter aparecido primeiro em ambiente hospitalar, rapidamente surgiram os primeiros casos de infeções na comunidade causados por clones específicos de MRSA²³. Hoje em dia já é difícil de fazer uma distinção entre estirpes típicas de ambiente hospitalar e da comunidade. A resistência à metilina no *S.aureus* deve-se à aquisição do gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina extra, a PBP-2a. A PBP-2a apresenta uma baixa afinidade para todos os antibióticos β -lactâmicos, o que leva a resistência a quase todas as classes de antibióticos²³.

Estirpes de *K. pneumoniae* resistentes aos principais antibióticos usados na sua terapêutica têm emergido e disseminado pelo meio ambiente, o que leva a uma crescente procura pelo conhecimento dos mecanismos que esta bactéria utiliza para resistir no meio ambiente⁵⁴. Associada à resistência há que ter em conta a patogénese da *K. pneumoniae* que produz estruturas extracelulares como cápsulas que são compostas por polissacáridos, que podem ser classificadas em 77 serótipos⁵⁵. As estirpes com antígenos capsulares K1, K2, K4 e K5 são consideradas as mais virulentas⁵⁵. O gene cromossomal *magA*, que codifica para a proteína MagA, específica do serotipo capsular K1, é um gene de virulência associado a estirpes de *K. pneumoniae* invasivas e é responsável pelo fenótipo de hiper mucoviscosidade⁵⁴.

O aumento da concentração de antibióticos no meio ambiente conduz, portanto, à emergência de estirpes multirresistentes o que poderá desencadear situações em que

não existam antibióticos disponíveis para o tratamento^{1,23}. Consequentemente leva a uma diminuição da qualidade de vida e saúde pública o que conduz a um aumento das despesas com a saúde e com o ambiente.

1.3.2. Formação de Biofilmes e Resistência a Antibióticos

Na natureza, a maioria das bactérias vive numa estreita associação com superfícies abióticas formando comunidades complexas referidas como biofilmes^{56, 57}. Os biofilmes podem aparecer em sistemas de água potável e em águas de superfície, no entanto apresentam uma maior densidade e diversidade nos sistemas de águas residuais^{58, 59}.

As diferentes estirpes de uma determinada espécie bacteriana podem ter diferentes capacidades de formação de biofilmes. A capacidade de uma bactéria aderir às superfícies é importante para a sua disseminação, uma vez que quando comparadas com a sua forma platónica (não aderente), as bactérias presentes nos biofilmes, apresentam uma maior capacidade de resistência a biocidas convencionais e tratamentos antimicrobianos^{40, 57}.

Na família das *Enterobacteriaceae*, as propriedades adesivas são mediadas por diferentes tipos de fímbrias, projeções filamentosas não flagelares na superfície bacteriana^{54, 55}. No caso de isolados de *K. pneumoniae*, as fímbrias do tipo 3, codificadas no operão *mrk*, são manose resistente e desempenham um papel fundamental na formação de biofilmes^{23,55, 56}. As estruturas capsulares presentes em alguns isolados de *K. pneumoniae* contribuem também para o desenvolvimento de biofilmes, uma vez que as colónias mucoides apresentam uma consistência viscosa o que permite uma melhor adesão das bactérias a uma superfície^{54,55}. A biossíntese do polissacárido capsular é controlada positivamente pela proteína *RmpA*, codificada pelo gene plasmídico *rmpA*, controlando assim, o fenótipo mucóide^{54,55}.

Também algumas estirpes de *P. aeruginosa* apresentam um fenótipo mucóide devido à produção de cápsulas de alginato, o que facilita a aderência a superfícies,

facilitando a formação de biofilmes^{23, 58}. Os *pili* presentes na *P. aeruginosa* desempenham um papel importante na formação de biofilmes²³.

As comunidades bacterianas presentes em biofilmes e a sua resistência inerente aos agentes antimicrobianos estão na base de muitas infecções persistentes e crônicas^{40, 59}.

1.4. Objetivos

A hipótese apresentada neste trabalho é estudar a possível utilização de matrizes como o carvão ativado ou o *biochar* para a remoção de bactérias multirresistentes de sistemas de purificação de águas residuais. Tendo em conta a hipótese apresentada, este trabalho tem como objetivo verificar se os carvões ativados ou o *biochar* poderão estar na base de uma metodologia a aplicar em processos de depuração de águas residuais. De modo a acompanhar a eficiência do processo de tratamento águas residuais, são propostas 2 etapas:

1. Determinar a cinética de adsorção de bactérias multirresistentes a diferentes matrizes de carvão (um comercial e um produzido em laboratório).
2. Verificar através de microscopia eletrónica de varrimento, a adsorção das bactérias multirresistentes às diferentes matrizes utilizadas.

CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. Materiais e Métodos

2.1. Matrizes

As matrizes utilizadas no estudo desenvolvido consistem em carvão ativado de origem comercial (CC) e *biochar* produzido em laboratório através de serradura de pinheiro (CS).

O carvão CC é o Norit super SAE (Lote: 8044-0) com granulometria igual ou inferior a 0,149mm.

2.1.1. Preparação das Matrizes

2.1.1.1. Carvão CC

O carvão CC é o material comercializado pela empresa Norit – Cabot como NS super SAE com granulometria igual ou inferior a 0,149mm. O carvão foi peneirado (Peneiros - Retsch 0,149 e 0,074mm) de forma a obter amostras com granulometria igual ou inferior a 0,149mm e inferior a 0,074mm. Este carvão é comercializado para tratamento de águas residuais, nomeadamente para a remoção de compostos orgânicos presentes nestas águas.

2.1.1.2. *Biochar* CS

O *biochar* CS foi preparado a partir de serradura, previamente peneirada num passador de malha fina. O processo experimental compreendeu duas etapas: a digestão ácida e a policondensação. Para a digestão ácida foram pesadas 4g de serradura que foram colocadas durante 10 -15 minutos em 40 mL ácido sulfúrico aquoso (Sigma Aldrich 95,0 – 97,0 %; Peso molecular: 98,08) em banho húmido a 50°C (VWR Scientific 1201 water bath) com agitação mecânica. No fim desta reação, o líquido negro foi recolhido para ser aplicado na síntese posterior. De seguida, a solução obtida anteriormente foi aquecida sob refluxo até 90°C durante 6h. Os

produtos sólidos (*biochars*) foram recuperados por filtração e lavados até atingirem um pH neutro e secos a 100°C.

Para a obtenção da amostra CS em pó, foi necessário proceder-se à moagem no moinho de bolas (Retsch S1) e, no fim peneiração (Peneiro – Retsch 0,074mm) de modo a obter partículas com dimensões menores que 0,074mm.

2.2. Seleção das Estirpes Bacterianas

Para a realização deste projeto foram selecionadas várias espécies bacterianas, esta escolha teve como base os potenciais perigos da existência de determinados microrganismos no meio ambiente, nomeadamente no meio aquático e a sua patogenicidade para o ser humano. Foram selecionadas espécies com resistência e sem resistência a antimicrobianos de modo a avaliar se a presença ou ausência de resistências pode influenciar a sua afinidade com as superfícies das diferentes matrizes utilizadas. Sendo assim, foi selecionada uma estirpe Gram positivo, *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 que é uma bactéria multirresistente, apresentando resistência à metilina (*methicilin-resistant S. aureus* – MRSA). Entre as bactérias Gram negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23708, ambas estirpes sensíveis e 4 estirpes de *Klebsiella pneumoniae* (2948, 45, 703 e 4889 – provenientes da coleção de bactérias da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL)) com diferentes resistências a antibióticos.

A *K. pneumoniae* FFUL 2948 é uma bactéria multirresistente que apresenta resistência aos carbapenemos e possui o antígeno capsular K2, sendo por isso considerada uma das estirpes mais virulentas⁵⁴. A *K. pneumoniae* FFUL 45 possui o antígeno capsular K2. A *K. pneumoniae* FFUL 4889 é uma bactéria multirresistente, apresentando resistência ao carbapenemos e à colistina. Por fim a *K. pneumoniae* FFUL 703 que não possui cápsula, o que poderá influenciar a sua interação com a superfície das matrizes.

Foi dado ênfase às bactérias Gram negativo uma vez que são estas que representam uma maior preocupação a nível da saúde pública pois são as que

apresentam uma maior resistência aos antibióticos e também são mais comuns em meio aquático.

2.3. Ensaios de Adsorção

2.3.1. Interação entre as Matrizes e as Estirpes Bacterianas

O procedimento experimental foi adaptado do reportado por Naka *et al.*⁵⁶.

Preparou-se a suspensão bacteriana em meio Tryptic Soy Broth (TSB - pH≈7) que foi a incubar durante 1 hora a 37°C com agitação (Agitador – STNART Rotator SB2). Após o período de incubação, colocou-se 5 mL da suspensão em cada um dos tubos, onde previamente tinham sido colocadas as quantidades de amostra (CC 0,074mm, CC 0,149mm ou CS 0,074mm) a utilizar (5mg e 15mg). Colocaram-se os tubos a incubar a 37°C sob agitação durante os tempos de contacto previamente estabelecidos (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos). No final de cada tempo de contacto, retirou-se o tubo correspondente do agitador, centrifugou-se a 2000rpm (Centrifugadora – Sigma 201) durante 5 minutos e retirou-se uma alíquota (200 µL) para medir a absorvância ao comprimento de onda de 600nm (Espectrofotómetro – Nocaspec II visible spectrophotometer). Segundo Suttonn, este comprimento de onda é o mais correto para quantificação de bactérias⁶¹.

Como foi referido anteriormente a suspensão bacteriana foi preparada em meio TSB que apresentava um pH ≈7, o solvente utilizado para a preparação deste meio foi água destilada, sendo assim, ao longo dos ensaios, as bactérias encontravam-se em caldo nutritivo com um pH neutro.

Em paralelo com o ensaio de adsorção, o crescimento bacteriano também foi avaliado, através do controlo positivo do crescimento bacteriano (branco).

Para a quantificação das bactérias em meio de cultura, foi retirada uma alíquota de 10µL dos tubos (do controlo do crescimento bacteriano (branco) aos 0 e aos 90 minutos e dos tubos com amostra e bactérias aos 90 minutos). As alíquotas

foram diluídas em água destilada estéril (ADE) e, posteriormente foram plaqueados 100 µL em meio de gelose de sangue (BIOMÉRIEUX).

2.4. Interação entre as Matrizes e as Águas Residuais

Neste ensaio, foram utilizadas águas provenientes do afluente de uma ETAR, com uma carga bacteriana desconhecida.

Ao realizar este ensaio foi possível verificar a eficácia das amostras utilizadas em ambiente natural, ou seja, na presença tanto de várias estirpes bacterianas como com os vários compostos orgânicos presentes em águas residuais.

Tal como o ensaio de interação entre as matrizes e as espécies bacterianas, este ensaio foi realizado e adaptado de acordo com Naka et al.⁶². O procedimento experimental foi igual ao realizado com as diferentes espécies bacterianas, no entanto o branco foi feito utilizando a água residual diretamente, isto é, não foi realizada qualquer diluição.

O procedimento experimental para a quantificação das bactérias também foi igual ao dos ensaios com as diferentes espécies bacterianas.

2.5.Cura de Plasmídeos

Realizou-se a cura de plasmídeos na *K. pneumoniae* 2948, que é constituída por um plasmídeo que lhe confere resistência aos carbapenemos e ao restante grupo dos β-lactâmicos.

Para tal, foi feita uma cultura de bactérias em meio Tryptic Soy broth (TSB – comercializado pela BioKar) (5 mL), incubada a 37°C de onde foi, posteriormente retirada uma alíquota de 10µl, que foi colocada noutra tubo com meio TSB. As passagens foram realizadas de 2 em 2 dias durante 2 semanas. Quando terminadas as passagens, verificou-se a suscetibilidade da bactéria aos antimicrobianos segundo o método de difusão em disco Kirby-Bauer, em meio Müller-Hinton agar (MHA – comercializado pela BioKar, com discos de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg),

cefotaxima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), imipenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) gentamicina (10 µg).

Os antibióticos utilizados são comercializados pela BioRad.

Os halos de inibição foram interpretados de acordo com o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing⁶⁰.

2.6. Ensaio de Detecção de Biofilmes

2.6.1. Detecção de Biofilmes nas paredes dos tubos

Este ensaio teve como objetivo principal perceber se as bactérias estudadas estavam a ser realmente removidas pelo carvão ativado e pelo *biochar* ou se estavam a ficar retidas nas paredes dos tubos de plástico.

A detecção de biofilmes nas paredes dos tubos foi realizada nas espécies bacterianas que são conhecidas por formar biofilmes mais facilmente: *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Este ensaio foi realizado no *biochar* CS e no carvão CC <0,074mm.

Para a detecção de biofilmes nas paredes dos tubos utilizados no ensaio de adsorção, foi retirado todo o conteúdo dos tubos (amostra + suspensão), de seguida lavou-se o tubo 3 vezes com ADE e colocou-se uma solução de violeta de cristal a 4% e aguardou-se 15 minutos. Posteriormente, descartou-se o cristal violeta e lavou-se novamente o tubo 3 vezes com ADE, colocou-se 5mL de etanol a 96%. Ao final de 15 minutos, mediu-se a absorvância a 570nm.

Para realizar este ensaio, foi utilizado um controlo negativo – um tubo vazio; um controlo positivo – o tubo de controlo do crescimento bacteriano (branco).

2.6.2. Detecção de Biofilmes nas Matrizes

As diferentes espécies bacterianas têm diferentes capacidades de formação de biofilmes. Logo, quando se utiliza uma matriz de carvão ativado ou *biochar* para remoção de bactérias de uma suspensão, as bactérias podem ficar adsorvidas à superfície dessa matriz formando um biofilme.

Ao obter imagens das bactérias adsorvidas à superfície das matrizes através de um microscópio eletrónico de varrimento (SEM), é possível verificar se as matrizes utilizadas neste projeto são uma alternativa para a remoção de bactérias multirresistentes de águas residuais.

Um microscópio eletrónico de varrimento (SEM) é um tipo de microscópio eletrónico que produz imagens de uma amostra, varrendo a sua superfície com um feixe de eletrões focado. O SEM permite a obtenção de imagens de alta resolução de uma amostra. Contudo, para estudar um determinado evento através do SEM, é necessário um conhecimento especializado das técnicas aplicadas neste campo, nomeadamente na preparação da amostra a estudar.

As bactérias utilizadas neste ensaio foram a *K. pneumoniae* 703 e a 2948 e a *P. aeruginosa* nas amostras CS e CC <0,074mm.

Após o ensaio de adsorção das bactérias, a matriz presente no tubo dos 90 minutos foi lavada e recolhida para um *ependorf* com uma solução fixadora (Paraformaldeído 4%)

Após a recolha da matriz, as amostras foram enviadas para o Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge onde a Dr.^a Luísa Jordão procedeu ao tratamento das amostras para obtenção das imagens do SEM.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e Discussão

3.1. Matrizes

3.1.1. Carvão CC

Tal com referido na parte experimental, esta amostra foi peneirada de modo a obter 2 frações com granulometrias diferentes, isto é, partículas com dimensões inferiores a 0,074mm e iguais ou inferiores a 0,149mm.

Relativamente aos parâmetros texturais, esta amostra apresenta uma área superficial de $1070 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, um volume de microporos de $0,36 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, um volume de mesoporos de $0,43 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ e um pH_{pzc} de 8,4 ⁶³.

Na Figura 3 está reproduzida uma imagem SEM do carvão CC com granulometria inferior a 0,074mm.

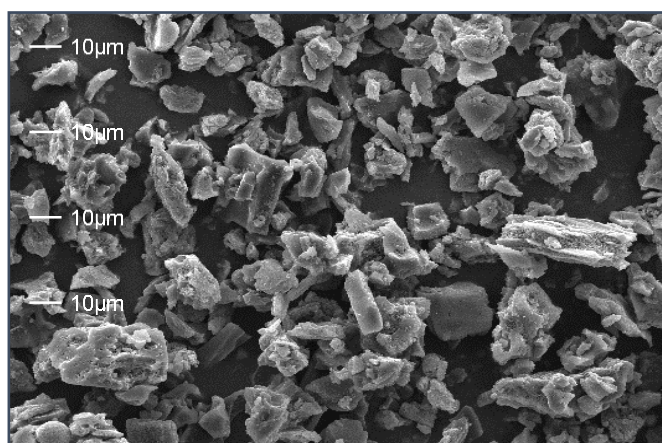


Figura 3 Microfotografia do carvão CC <0,074mm, ampliação 500x.

3.1.2. Biochar CS

• Rendimento de preparação:

Para a preparação do *biochar* CS foram utilizadas 8,0192g de serradura, com as quais se obteve 5,6041g de amostra.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

Conclui-se que o processo de preparação teve um rendimento de 63%. Para além das perdas que podem ter ocorrido durante as lavagens para a obtenção de um pH neutro, terá igualmente sido perdida alguma amostra durante a moagem e peneiração.

O *biochar* obtido a partir do material utilizado não apresenta uma estrutura de poros desenvolvida e apresenta um pH_{pzc} de 2⁶⁴. Na Figura 4 está reproduzida uma imagem SEM do *biochar* CS.

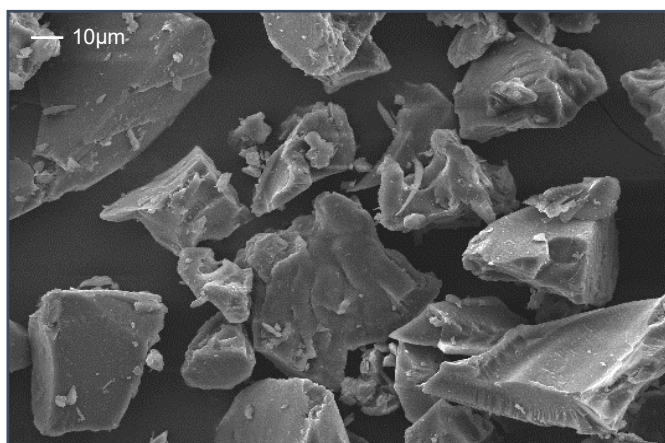


Figura 4 Microfotografia do *biochar* CS, ampliação 500x.

3.2. Ensaio de Interação entre as Matrizes e as Estirpes Bacterianas

Os ensaios de interação entre as matrizes e as estirpes bacterianas foram realizados com o *biochar* preparado em laboratório (CS), e com as duas frações do carvão ativado comercial CC com granulometrias $<0,074\text{mm}$ e $\leq 0,149\text{mm}$. Os ensaios foram realizados com 5 e 15 mg de cada uma das matrizes. Em paralelo com os ensaios de adsorção o crescimento bacteriano também foi avaliado, cujo inóculo apresentava uma concentração inicial entre 10^5 e 10^6 bactéria/mL.

Em paralelo, para confirmar os dados obtidos pelos ensaios de adsorção, o crescimento da bactéria também foi avaliado em meio de cultura aos 0 minutos (branco) e depois de incubação a 37°C durante 90 minutos e com uma quantidade de 5mg e 15mg de cada uma das matrizes.

À medida que a bactéria no ensaio em branco se vai multiplicando, a sua absorvância aumenta, portanto nos ensaios na presença das matrizes é esperado que à medida que a bactéria se vai multiplicando, esta seja adsorvida à superfície o que fará com que as absorvâncias registadas nos tubos com a amostra sejam inferiores às registadas no tubo do ensaio em branco.

O carvão CC como é um carvão ativado, apresenta uma rede de poros bem desenvolvida, enquanto que o *biochar* CS não possui uma rede desenvolvida o que poderá levar a que as bactérias tenham comportamentos diferentes na presença de cada um destes carvões. Uma vez que o tamanho das bactérias (na ordem dos μm) é bastante superior ao tamanho dos poros do carvão ativado (na ordem dos nm), as bactérias ficam adsorvidas à superfície do carvão e não entram nos poros.

Para retirar a alíquota necessária para fazer a medição das absorvâncias nos tubos com carvão foi necessário realizar uma centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos. De modo a provar que a centrifugação não depositava as bactérias no fundo dos tubos realizou-se um ensaio em que eram medidas as absorvâncias de um tubo

com bactérias que sofria centrifugação e outro sem centrifugação. Como se pode verificar na Figura 5 não existe uma grande variação das absorvâncias nos dois tubos, validando-se assim o procedimento experimental.

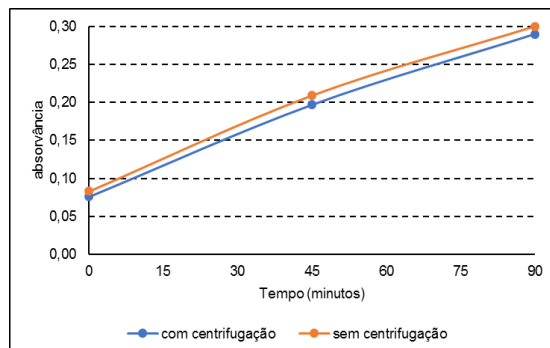


Figura 5 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano.

No final deste capítulo está representado um gráfico, para cada uma das amostras utilizadas, com as percentagens de eficiência de remoção das bactérias (aos 90 minutos de ensaio). Através destes gráficos, é possível observar melhor as diferenças entre as diferentes matrizes e estirpes estudadas. De modo a poder efetuar uma avaliação dos resultados coerente ao longo deste trabalho, foi estipulado que variações da eficiência de remoção das bactérias iguais ou inferiores a 10% não seriam consideradas significativas.

Também é importante referir que os ensaios realizados para cada uma das matrizes em estudo eram realizados a partir de inóculos diferentes da mesma bactéria, o que pode levar a diferentes quantidades de bacterianas no inóculo inicial de cada ensaio, o que por sua vez pode influenciar a leitura dos resultados, complicando a comparação entre cada uma das variáveis estudadas.

3.2.1. *E. coli* ATCC 25922

Em todos os ensaios realizados com a bactéria *E.coli* verificou-se uma diminuição do número de bactérias nos tubos com as matrizes, enquanto que no tubo

onde apenas estava a suspensão bacteriana (branco) verificou-se o esperado aumento das bactérias ao longo do tempo.

A *E.coli* apresentou uma maior diminuição do número de bactérias, em todos os tempos de contacto do ensaio com 15 mg tanto no *biochar* CS (Figura 6) como no carvão CC <0,074mm (Figura 7).

No caso do carvão CC $\leq 0,149$ mm (Figura 8) não existem diferenças muito significativas entre as duas quantidades de carvão utilizadas, apresentando as duas quantidades uma diminuição considerável do número de bactérias presentes na suspensão.

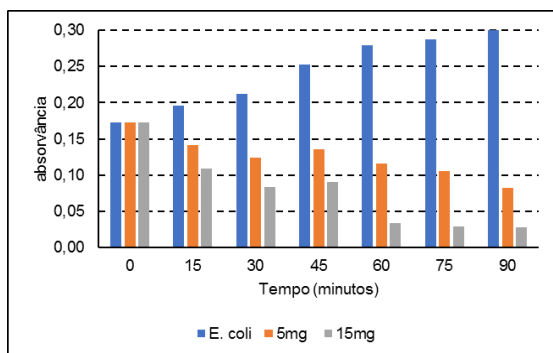


Figura 6 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *E. coli* ATCC 25922.

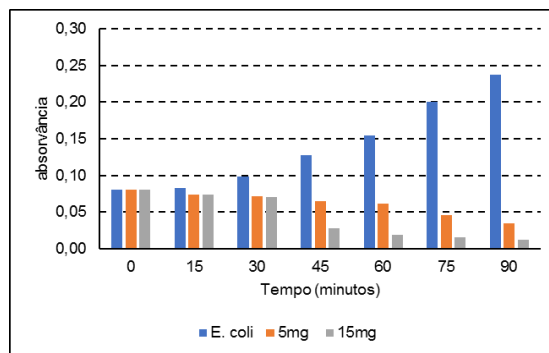


Figura 7 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de *E. coli* ATCC 25922.

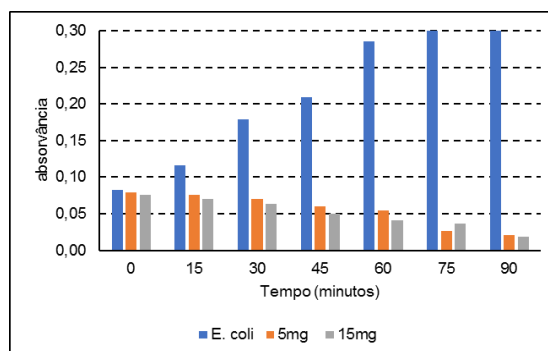


Figura 8 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *E. coli* ATCC 25922.

3.2.2. *S. aureus* ATCC 700699

Tal como se observou nos ensaios com a bactéria *E. coli*, também os testes com a bactéria *S.aureus*, mostraram uma diminuição do número de bactérias ao longo dos

tempos de contacto, no entanto neste caso não se observaram variações significativas com as diferentes quantidades de matrizes utilizadas.

Nos ensaios com o *biochar* CS (Figura 9) observou-se uma diminuição bastante acentuada do número de bactérias, sendo que no final do ensaio, a absorvância registada no tubo de controlo do crescimento bacteriano era de 0,075 e nos tubos com 5mg e 15mg de amostra os valores registados foram 0,020 e 0,017, respetivamente.

Nos ensaios com as amostras de carvão CC <0,074mm (Figura 10) e CC \leq 0,149mm (Figura 11) houve também uma diminuição significativa da quantidade de bactérias, contudo, nestes ensaios houve um maior crescimento bacteriano ao longo dos 90 minutos, o que dificulta a comparação dos resultados destes carvões com o *biochar* CS.

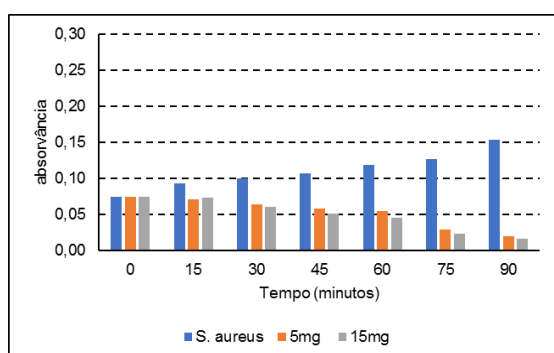


Figura 9 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *S.aureus* ATCC 700699.

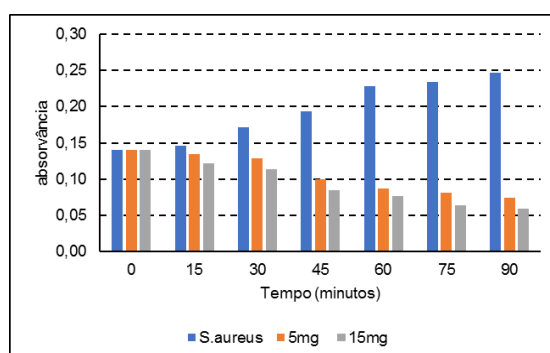


Figura 10 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de *S. aureus* ATCC 700699.

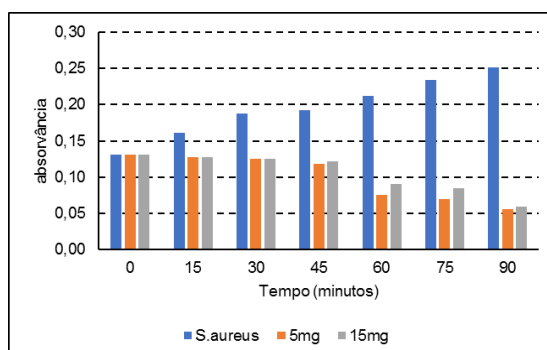


Figura 11 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC \leq 0,149 mm em 5 mL de inóculo de *S. aureus* ATCC 700699.

3.2.3. *P. aeruginosa* ATCC 23708

Os resultados relativos aos ensaios com a bactéria *P. aeruginosa* demonstraram que também neste caso há um efeito positivo das matrizes para a redução do número de bactérias em suspensão. No caso da aplicação do *biochar* CS (Figura 12) verificou-se que com 15 mg de amostra, se obteve uma ligeiramente diminuição do número de bactérias presentes na suspensão do que quando se testou 5 mg de matriz.

Através da análise dos gráficos das Figuras 13 (CC<0,074mm) e 14 (CC ≤0,149mm) pode concluir-se que, no carvão CC os resultados não demonstram que haja uma influência da granulometria, uma vez que ao longo dos ensaios, os valores de absorvância são semelhantes

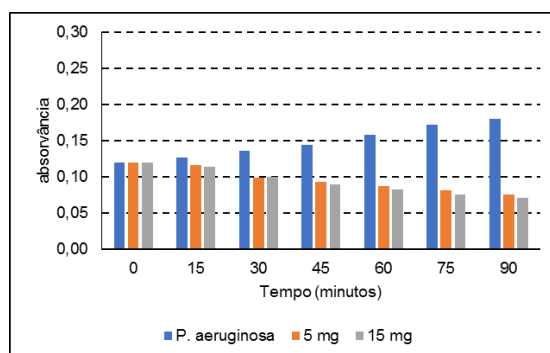


Figura 13 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 23708.

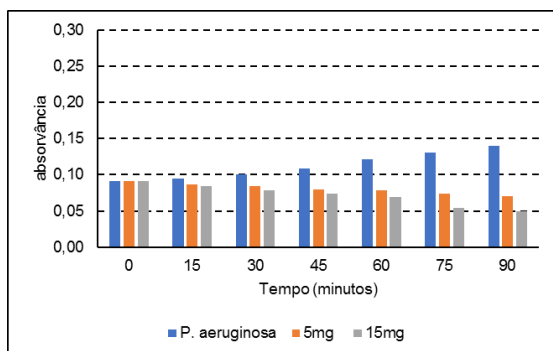


Figura 12 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 23708.

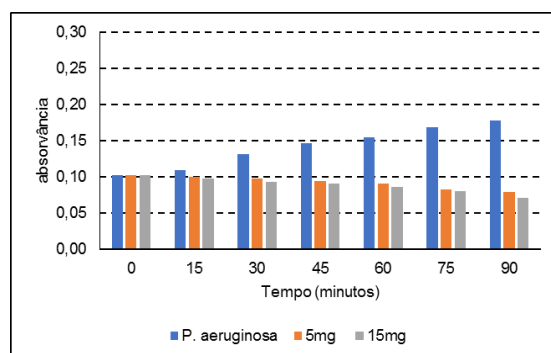


Figura 14 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 23708.

3.3.4. *K. pneumoniae*

O objetivo de utilizar diferentes estirpes de *K. pneumoniae* para realizar os ensaios de interação com as matrizes era averiguar se as resistências antimicrobianas que estas estirpes possuem poderiam influenciar de alguma forma a sua capacidade de ficarem adsorvidas à superfície das diferentes matrizes utilizadas.

Em todas as estirpes de *K. pneumoniae* estudadas, foi verificado um efeito positivo aquando da aplicação das diferentes matrizes utilizadas nos ensaios, havendo uma diminuição do número de bactérias ao longo dos tempos de contacto, enquanto no ensaio em branco a bactéria continua a crescer.

No caso da *K. pneumoniae* 4889 o número de bactérias diminuiu substancialmente na presença de qualquer uma das matrizes, no entanto o *biochar* CS (Figura 15) e o Carvão CC $\leq 0,149\text{mm}$ (Figura 17) apresentaram uma maior diminuição do número de bactérias, sendo que as duas quantidades de amostra utilizadas tiveram resultados bastante similares. No carvão CC $< 0,074\text{mm}$ (Figura 16), pode verificar-se que a partir dos 60 minutos de ensaio houve um aumento do número de bactérias presentes nos tubos com a amostra, o que pode significar que o carvão poderia estar saturado de bactérias e, como tal, perdeu a capacidade de adsorver mais bactérias à sua superfície ou, poderá ter existido algum erro durante o procedimento experimental.

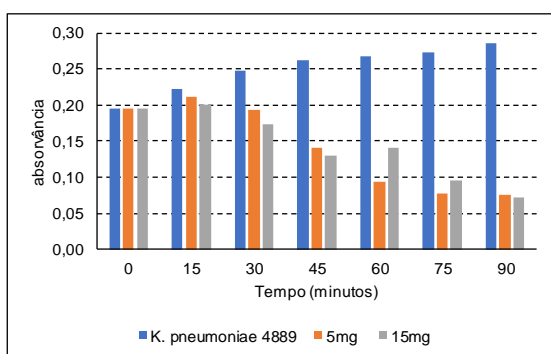


Figura 15 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 4889.

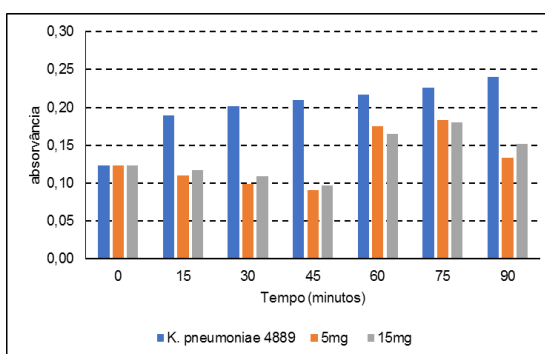


Figura 16 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $< 0,074\text{ mm}$ em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 4889.

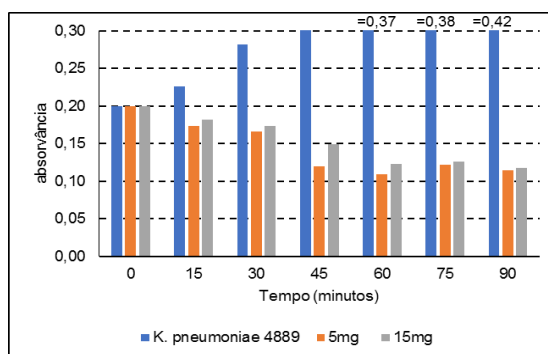


Figura 17 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 4889.

Relativamente aos ensaios com a bactéria *K. pneumoniae* 45, os resultados obtidos com os vários materiais estudados foram bastante semelhantes (Figuras 18 a 20).

No caso desta estirpe não parece que as diferentes propriedades das matrizes utilizadas tenham afetado a adsorção das bactérias à sua superfície.

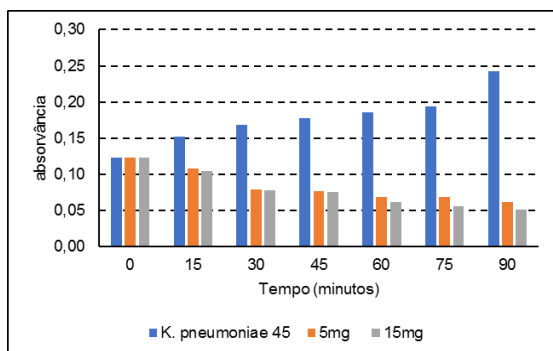


Figura 18 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 45.

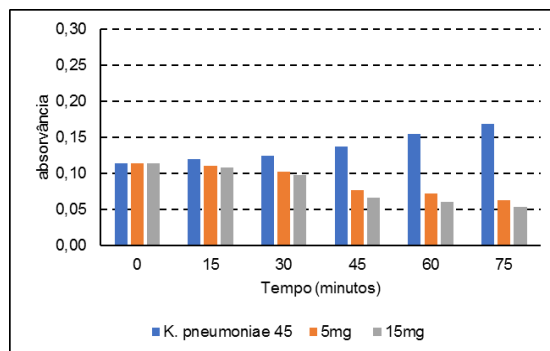


Figura 19 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $< 0,074$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 45.

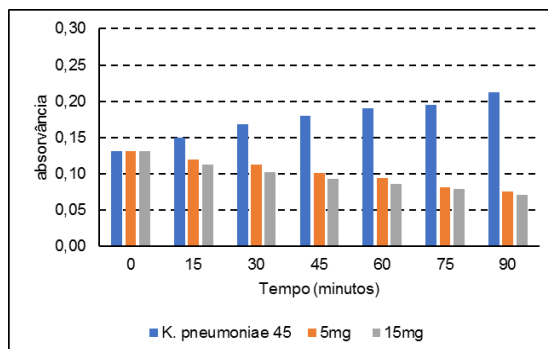


Figura 20 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 45.

Tal como as outras estirpes estudadas, a *K. pneumoniae* 703 apresentou um decréscimo de bactérias nos tubos onde estavam as matrizes quando comparados com o branco. No *biochar* CS, é notório um maior decréscimo da absorvância nos tubos com as amostras a partir dos 60 minutos (Figura 21).

O *biochar* CS, é o que apresenta melhores resultados na remoção de bactérias, principalmente no ensaio na presença de 15 mg de amostra.

No entanto, ao longo dos 90 minutos de ensaio, a adsorção das bactérias é gradual nas duas granulometrias do carvão CC (Figuras 22 e 23) e não apresenta variações muito acentuadas entre as duas quantidades de amostra utilizadas.

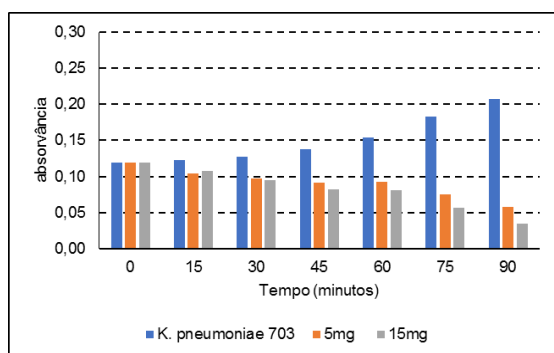


Figura 21 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 703.

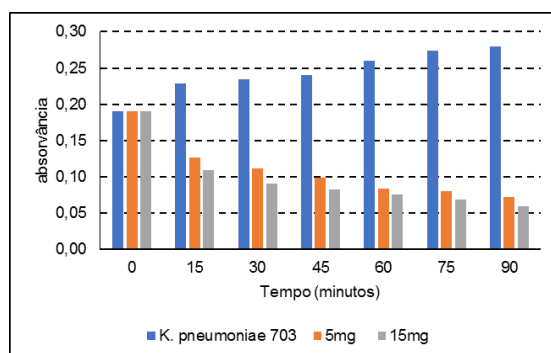


Figura 22 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 703.

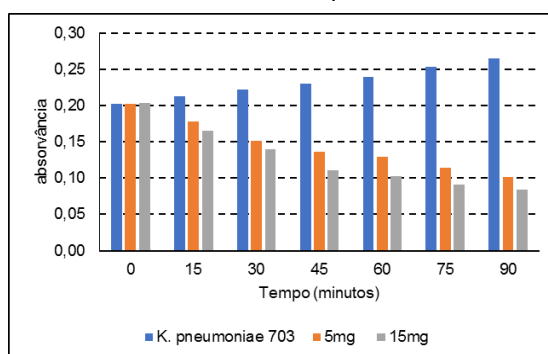


Figura 23 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de Carvão CC ≤0,149 mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 703.

Tal como tinha sido referido anteriormente, foram calculadas as percentagens de remoção das bactérias aos 90 minutos de cada um dos ensaios realizados, estes valores permitem uma melhor perceção e análise dos resultados obtidos.

Nas Figuras 24 a 26 estão representadas as percentagens de eficiência de remoção ao fim dos 90 minutos de ensaio de todas as bactérias estudadas, no *biochar* CS, no carvão CC <0,074 mm e no carvão CC ≤0,149 mm, respetivamente. As percentagens de remoção das bactérias foram calculadas recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{Remoção das Bactérias (\%)} = \frac{\text{abs branco} - \text{abs matriz}}{\text{abs branco}} \times 100$$

Em que *abs branco* representa a absorvância no tubo apenas contendo a suspensão bacteriana (branco) aos 90 minutos de ensaio e *abs matriz* representa a absorvância no tubo com a amostra utilizada e a suspensão de bactérias, também aos 90 minutos de ensaio.

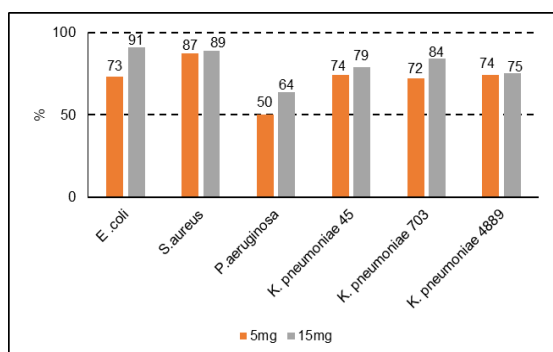


Figura 24 Percentagens de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CS.

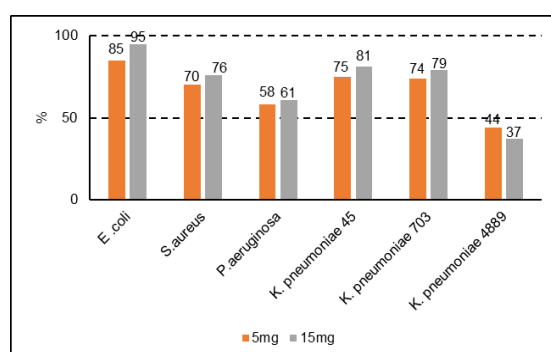


Figura 25 Percentagens de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC <0,074mm.

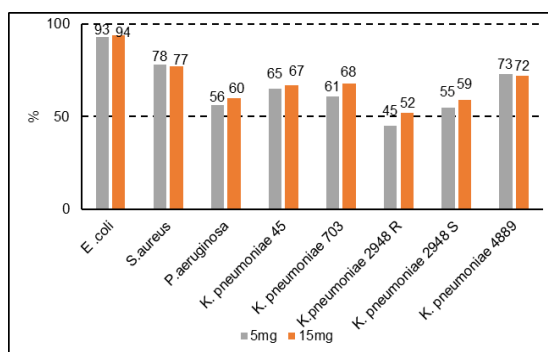


Figura 26 Percentagens de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC ≤0,149mm.

Os resultados obtidos usando o *biochar* CS (Figura 24) demonstram que todas as estirpes bacterianas estudadas, apresentaram eficiências de remoção superiores a 50% nas duas quantidades de amostra utilizadas.

A aplicação do carvão CC <0,074mm (Figura 25) levou a eficiências de remoção de bactérias também acima dos 50% para todas as estirpes, exceto para a *K. pneumoniae* 4889 para a qual no caso mais favorável atingiu-se apenas uma eficiência de remoção de 44 %. A *E.coli* foi a estirpe bacteriana com melhores resultados de eficiência da remoção, tendo apresentado resultados acima dos 90% quando eram utilizadas 15 mg de qualquer uma das matrizes.

Os melhores resultados de eficiência de remoção da bactéria *S. aureus* verificaram-se para o *biochar* CS (5mg – 87%; 15mg – 89%). No carvão CC a remoção apresentou valores acima dos 70% nas 2 granulometrias utilizadas, independentemente da quantidade de carvão. Estes resultados demonstram que a estrutura desta bactéria apresenta uma maior afinidade com o *biochar* CS, o que pode resultar do facto do *S. aureus* ser uma bactéria Gram positiva, logo, a membrana celular tem uma carga mais negativa do que uma bactéria Gram negativa²³. Como já foi referido anteriormente, tendo em conta as características acídicas apresentadas pela superfície do *biochar* CS, seria de esperar que este não fosse tão bem-sucedido na remoção de bactérias, no entanto os resultados demonstram que este material tem uma grande afinidade com a superfície das bactérias.

Nas diferentes matrizes utilizadas as eficiências de remoção da bactéria *P. aeruginosa* esteve compreendida, entre os 50 e os 64%. Tendo obtido a maior percentagem de remoção com 15 mg de *biochar* CS.

As eficiências de remoção da *K. pneumoniae* 45 situaram-se acima dos 70% no *biochar* CS e no carvão CC <0,074 mm, independentemente das quantidades utilizadas, e, ligeiramente inferiores no caso carvão CC ≤0,149 mm.

Na *K. pneumoniae* 703, o *biochar* CS – 15mg removeu 84% das bactérias, no carvão CC<0,074mm a remoção das bactérias ficou-se pelos 74% e 79% nas 5mg e 15mg, respetivamente. No caso do carvão CC≤0,0149mm as percentagens de remoção das bactérias para as 5mg e 15mg, foram, respetivamente, 61% e 68%.

Na *K. pneumoniae* 4889, o *biochar* CS e o carvão CC≤0,149mm apresentaram percentagens idênticas (> 70%), no entanto, tal como referido anteriormente, o carvão CC <0,074mm apresentou as percentagens mais baixas (<45%).

É de notar que, relativamente às diferentes quantidades de amostra utilizadas, não se verificou uma diferença significativa, com a exceção para a *P. aeruginosa* que apresenta uma maior percentagem de remoção das bactérias com 15mg de *biochar* CS.

De uma forma geral, o *biochar* CS foi o que apresentou melhores resultados de adsorção de bactérias na maioria das espécies bacterianas estudadas. Como já foi referido anteriormente o facto de o *biochar* CS apresentar um pH_{pzc} de 2 faz com que nas condições de ensaio, a sua carga fosse negativa, tendo em conta que as bactérias estudadas também apresentam uma carga negativa, não era expectável que este material apresentasse percentagens de remoção tão altas.

Relativamente aos dados obtidos na quantificação de bactéria viáveis em meio de cultura sólido todas as estirpes bacterianas apresentaram uma diminuição do número de unidades formadoras de colónias (UFC) nos tubos que continham amostra (Tabela 1). No entanto as diferenças entre as diferentes amostras e quantidades utilizadas, não são tão notórias quanto no ensaio da cinética da adsorção.

Não foram verificadas grandes variações de resultados entre as diferentes estirpes bacterianas utilizadas. No geral, a concentração de bactérias presentes no inóculo desceu de 10^6 para $10^4/10^5$. Os resultados obtidos através da quantificação de bactérias em meio de cultura, comprovam que tanto o *biochar* CS como o carvão CC nas duas frações poderão ser bons adsorventes de bactérias.

No geral, todas as matrizes utilizadas parecem ser bons adsorventes de bactérias, independentemente de ser uma bactéria Gram positivo ou Gram negativo.

As estirpes multirresistentes também apresentaram bons resultados de adsorção na superfície dos carvões. Numa visão geral, o *biochar* CS permitiu obter melhores resultados de absorção das bactérias do que o carvão CC independentemente da granulometria usada.

Tabela 1. Quantificação das bactérias em meio de cultura sólido no início (0min.) e no final (90min.) do ensaio de adsorção nas diferentes amostras. Os resultados estão apresentados em UFC/mL

Espécies Bacterianas	Tempo (min.)	Amostra CS		Amostra CC <0,074mm		Amostra CC <0,149mm	
		5mg	15mg	5mg	15mg	5mg	15mg
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0 (branco*)	$1,96 \times 10^6$ ($1,96 \times 10^6$)	$1,96 \times 10^6$ ($1,96 \times 10^6$)	$2,10 \times 10^6$ ($2,10 \times 10^6$)	$2,10 \times 10^6$ ($2,10 \times 10^6$)	$2,00 \times 10^6$ ($2,00 \times 10^6$)	$2,00 \times 10^6$ ($2,00 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$6,70 \times 10^5$ ($5,55 \times 10^6$)	$1,10 \times 10^5$ ($5,55 \times 10^6$)	$3,30 \times 10^5$ ($6,15 \times 10^6$)	$1,00 \times 10^5$ ($6,15 \times 10^6$)	$9,00 \times 10^4$ ($1,00 \times 10^7$)	$8,00 \times 10^4$ ($1,00 \times 10^7$)
<i>S.aureus</i> ATCC 700699	0 (branco*)	$4,36 \times 10^6$ ($4,36 \times 10^6$)	$4,36 \times 10^6$ ($4,36 \times 10^6$)	$3,97 \times 10^6$ ($3,97 \times 10^6$)	$3,97 \times 10^6$ ($3,97 \times 10^6$)	$3,58 \times 10^6$ ($3,58 \times 10^6$)	$3,58 \times 10^6$ ($3,58 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$6,90 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)	$6,30 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)	$1,00 \times 10^6$ ($1,00 \times 10^7$)	$8,80 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)	$8,10 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)	$7,90 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 23708	0 (branco*)	$3,70 \times 10^6$ ($3,70 \times 10^6$)	$3,70 \times 10^6$ ($3,70 \times 10^6$)	$4,80 \times 10^6$ ($4,80 \times 10^6$)	$4,80 \times 10^6$ ($4,80 \times 10^6$)	$4,69 \times 10^6$ ($4,69 \times 10^6$)	$4,69 \times 10^6$ ($4,69 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$8,90 \times 10^5$ ($8,00 \times 10^6$)	$8,50 \times 10^5$ ($8,00 \times 10^6$)	$9,40 \times 10^5$ ($9,50 \times 10^6$)	$9,50 \times 10^5$ ($9,50 \times 10^6$)	$9,70 \times 10^5$ ($9,00 \times 10^6$)	$9,10 \times 10^5$ ($9,00 \times 10^6$)
<i>K. pneumoniae</i> 45	0 (branco*)	$2,70 \times 10^6$ ($2,70 \times 10^6$)	$2,70 \times 10^6$ ($2,70 \times 10^6$)	$3,80 \times 10^6$ ($3,80 \times 10^6$)	$3,80 \times 10^6$ ($3,80 \times 10^6$)	$2,52 \times 10^6$ ($2,52 \times 10^6$)	$2,52 \times 10^6$ ($2,52 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$7,60 \times 10^5$ ($8,64 \times 10^6$)	$7,90 \times 10^5$ ($8,64 \times 10^6$)	$7,50 \times 10^5$ ($9,60 \times 10^6$)	$7,10 \times 10^5$ ($9,60 \times 10^6$)	$8,10 \times 10^5$ ($9,50 \times 10^6$)	$8,30 \times 10^5$ ($9,50 \times 10^6$)
<i>K. pneumoniae</i> 703	0 (branco*)	$2,00 \times 10^6$ ($2,00 \times 10^6$)	$2,00 \times 10^6$ ($2,00 \times 10^6$)	$2,50 \times 10^6$ ($2,50 \times 10^6$)	$2,50 \times 10^6$ ($2,50 \times 10^6$)	$2,67 \times 10^6$ ($2,67 \times 10^6$)	$2,67 \times 10^6$ ($2,67 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$2,50 \times 10^5$ ($6,20 \times 10^6$)	$1,90 \times 10^5$ ($6,20 \times 10^6$)	$3,20 \times 10^5$ ($7,00 \times 10^6$)	$3,00 \times 10^5$ ($7,00 \times 10^6$)	$6,90 \times 10^5$ ($7,50 \times 10^6$)	$6,50 \times 10^5$ ($7,50 \times 10^6$)
<i>K. pneumoniae</i> 4889	0 (branco*)	$3,50 \times 10^6$ ($3,50 \times 10^6$)	$3,50 \times 10^6$ ($3,50 \times 10^6$)	$5,20 \times 10^6$ ($5,20 \times 10^6$)	$5,20 \times 10^6$ ($5,20 \times 10^6$)	$4,00 \times 10^6$ ($4,00 \times 10^6$)	$4,00 \times 10^6$ ($4,00 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$6,60 \times 10^5$ ($6,00 \times 10^6$)	$5,10 \times 10^5$ ($6,00 \times 10^6$)	$8,50 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)	$9,80 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^7$)	$6,20 \times 10^5$ ($8,00 \times 10^6$)	$6,00 \times 10^5$ ($8,00 \times 10^6$)

*Quantificação das bactérias no inóculo inicial e após os 90 minutos do ensaio de adsorção.

3.3. Cura de Plasmídeos

Nos últimos anos, foram observados plasmídeos numa grande variedade de bactérias⁶⁵. Em parte, isso se deve ao desenvolvimento de novos procedimentos que permitem a detecção, isolamento e caracterização molecular do DNA plasmídico. A maioria dos plasmídeos é extremamente estável e requer o uso de agentes de cura ou outros procedimentos como, temperatura de crescimento elevada, para aumentar a segregação espontânea⁶⁵.

A estirpe *K. pneumoniae* 2948 R, apresentava resistência a todos os antibióticos ensaiados com exceção à ciprofloxacina, tal como se indica na Tabela 2. Entre os mecanismos de resistência pesquisados foi detetada a presença da carbapenemase KPC-3, uma β -lactamase que confere resistência aos carbapenemos, representado na Figura. 5 por imipenemo (IMP). Esta enzima também afetou a sua resistência às cefalosporinas e ao restante grupo dos β -lactâmicos. Esta enzima está num elemento móvel transposição o qual está inserido num plasmídeo.

Tabela 2. Suscetibilidade a antibióticos da *K. pneumoniae* 2948 antes e depois da cura de

Estirpe	AMC	CTX	FOX	CAZ	IMP	CIP	GM
<i>K. pneumoniae</i> 2849 R	6	13	11	6	11	19	13
<i>K. pneumoniae</i> 2948 S	15	24	13	18	27	16	21

*Os resultados são apresentados em milímetros, em que estes, representam os halos de inibição à volta dos discos de antibiótico

**amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoxitina (FOX), ciprofloxacina (CIP), imipenemo (IMP) e gentamicina (GM).

Após as sucessivas passagens pelo meio TSB verificou-se um aumento da suscetibilidade – Figura 27 B, representado pelo alargamento dos halos de inibição, especialmente para os antibióticos imipenemo, ceftazidima e cefotaxima. Estes resultados são indicadores da perda de plasmídeo, o que permitiu realizar o ensaio de adsorção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos.

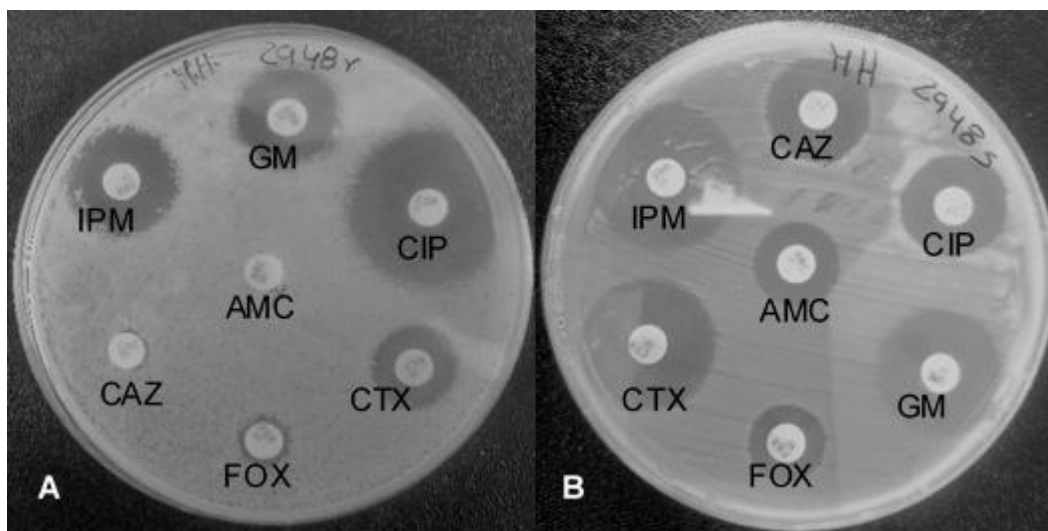


Figura 27 Antibiógrama da bactéria *K. pneumoniae* 2948 A) Antes da cura de plasmídeos e B) Depois da cura de plasmídeos, usando discos dos antibióticos amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoxitina (FOX), ciprofloxacina (CIP), imipenemo (IMP) e gentamicina (GM).

No caso da *K. pneumoniae* 2948 os ensaios nas matrizes foram realizados com a estirpe resistente *K. pneumoniae* 2948 R e com a estirpe sensível *K. pneumoniae* 2948 S, sendo que o inóculo apresentava uma concentração inicial entre 10^5 e 10^6 bactéria/mL.

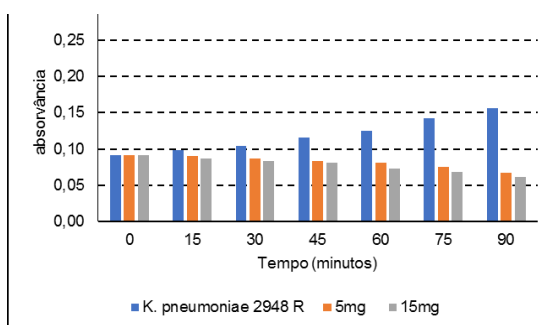


Figura 29 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC < 0,074 mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 R.

Os resultados que se apresentam nas Figuras 28 a 30 demonstram que todas as amostras permitiram a remoção da *K. pneumoniae* 2948 R, dado que a absorvância das suspensões após contacto com as matrizes é menor que ao correspondente ao ensaio em branco, isto é, crescimento da bactéria na ausência de amostra.

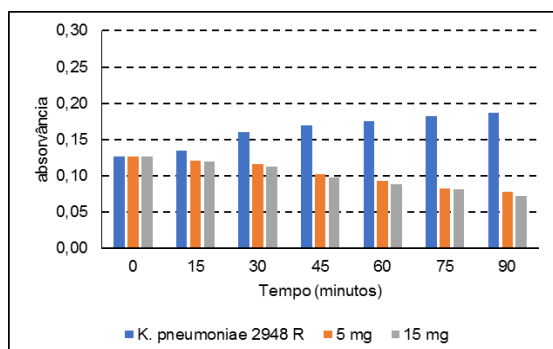


Figura 28 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 R.

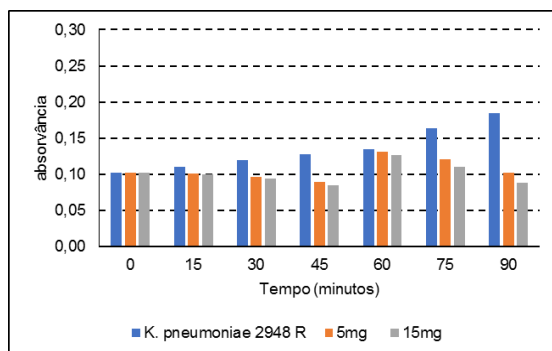


Figura 30 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948. R.

Na *K. pneumoniae* 2948 S (Figuras 31 a 33) também foi verificada uma diminuição das bactérias na presença das matrizes, enquanto o crescimento da bactéria aumentou no tubo sem amostra de carvão ou *biochar*.

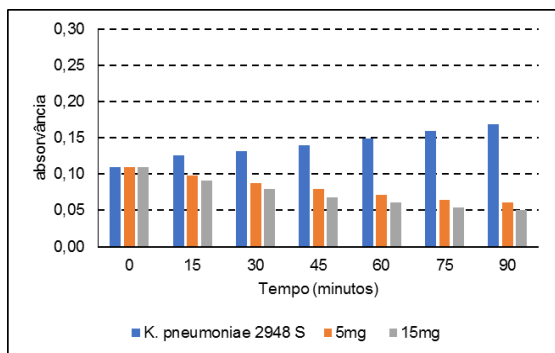


Figura 31 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 S.

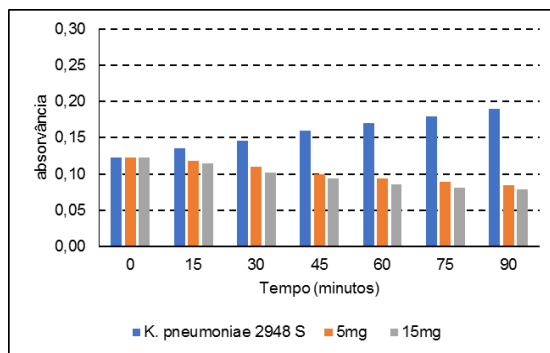


Figura 32 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $< 0,074$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 S.

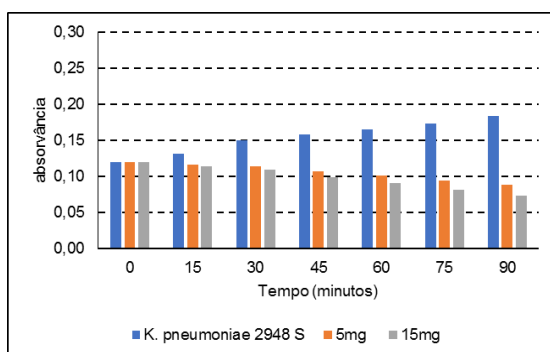


Figura 33 Absorvância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) versus tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC $\leq 0,149$ mm em 5 mL de inóculo de *K. pneumoniae* 2948 S.

Nas Figuras 34 a 36, estão representadas as percentagens de remoção aos 90 minutos do ensaio de adsorção de bactérias com a *K.pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos, no *biochar* CS e nos carvões CC <0,074mm e ≤0,149mm, respetivamente.

Com o *biochar* CS (Figura 34) a *K. pneumoniae* 2948 S apresentou maiores percentagens de remoção do que a *K. pneumoniae* 2948 R o que poderá significar que a perda do plasmídeo, conferiu a esta bactéria uma maior afinidade com a superfície deste material.

Relativamente às quantidades utilizadas, no ensaio com 15 mg de *biochar* CS houve um aumento da remoção de bactérias sendo que a *K. pneumoniae* 2948 S chegou aos 70% e a *K.pneumoniae* 2948 R ficou pelos 64%, contudo, a remoção de bactérias foi sempre superior com 15mg de amostra.

No caso do carvão CC <0,074mm (Figura 35) a quantidade de matriz não teve uma grande influência na percentagem de remoção das bactérias. Com efeito, a remoção da *K. pneumoniae* 2948 S no ensaio com 5 mg atingiu um valor ligeiramente superior à do ensaio com 15 mg de carvão, e no caso da *K. pneumoniae* 2948 R as percentagens de remoção das bactérias foram bastante semelhantes nas duas quantidades de carvão utilizadas.

Nos ensaios com o carvão CC ≤0,149mm (Figura 36) as percentagens de remoção da *K. pneumoniae* 2948 S foram ligeiramente superiores às obtidas com a *K. pneumoniae* 2948 R, para as duas quantidades de carvão utilizadas.

Dado as dimensões relativas dos poros do carvão e das bactérias, estas, só são retidas pela superfície externa do carvão. Logo, as partículas de granulometria superior apresentam uma área superficial menor do que as partículas de granulometria inferior, o que poderia levar a que menos bactérias adsorvam à superfície do carvão CC≤ 0,149mm, no entanto, nos ensaios realizados, não é visível uma variação significativa entre as 2 granulometrias utilizadas.

O *biochar* CS apresentou percentagens de remoção mais elevadas do que o carvão CC <0,074mm e CC ≤0,149mm, tanto na *K. pneumoniae* 2948 R como na *K. pneumoniae* 2948 S. Este facto pode estar relacionado com as propriedades que distinguem o *biochar* CS do carvão CC. Apesar das diferentes percentagens de remoção apresentadas pela *K. pneumoniae* 2948 antes e depois da perda do plasmídeo, estas não são superiores a 9%, o que poderá significar que a possível perda do plasmídeo não representa uma alteração significativa para a afinidade da bactéria com a superfície das amostras.

O *biochar* CS possui um pH_{pzc} de 2⁶³ e o carvão CC tem um pH_{pzc} de 8,4⁶⁴ o que significa que nas condições de ensaio em que o meio utilizado tinha um pH neutro, a amostra CS possuía carga negativa e a amostra CC possuía uma carga positiva, logo, sendo a *K pneumoniae* 2848 R uma bactéria Gram negativo, possui uma parede celular com carga negativa, seria de esperar que tivesse uma maior afinidade com a superfície do carvão CC. Como isto não se verificou, uma possível explicação é que a interação entre as bactérias e a superfície das amostras não tem só um carácter electrostático, podendo estar relacionado com o tipo de centros superficiais.

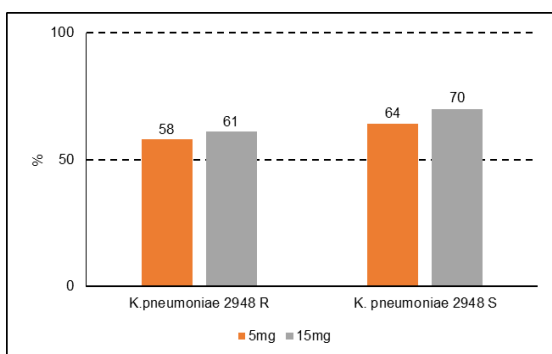


Figura 34 Percentagens de remoção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos no ensaio de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CS.

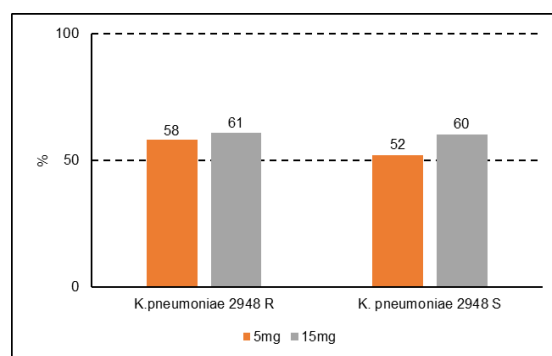


Figura 35 Percentagens de remoção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes suscetibilidades aos antibióticos no ensaio de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC <0,074mm.

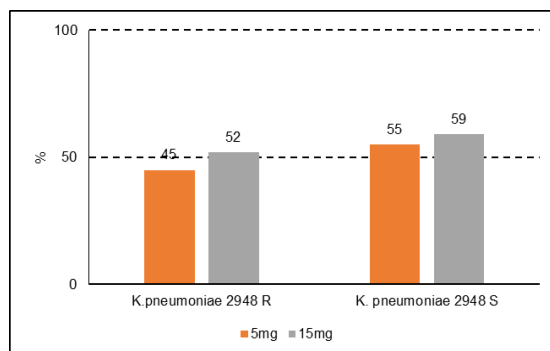


Figura 36 Percentagens de remoção da estirpe *K. pneumoniae* 2948 com diferentes susceptibilidades aos antibióticos no ensaio de adsorção com 5mg e 15mg de amostra CC ≤ 0,149mm.

Relativamente aos dados obtidos através da quantificação de bactérias viáveis em meio de cultura sólido (Tabela 3), os resultados foram muito semelhantes aos obtidos com as outras estirpes bacterianas, sendo que, entre as diferentes amostras, não foi verificada uma grande variação do número UFC na estirpe com e sem o plasmídeo.

Tabela 3. Quantificação das bactérias em meio de cultura sólido no início (0min.) e no final (90min.) do ensaio de adsorção nas diferentes amostras. Os resultados estão apresentados em UFC/mL

Espécies Bacterianas	Tempo (min.)	Amostra CS		Amostra CC <0,074mm		Amostra CC <0,149mm	
		5mg	15mg	5mg	15mg	5mg	15mg
<i>K. pneumoniae</i> 2948 R	0 (branco*)	$2,70 \times 10^6$ ($2,70 \times 10^6$)	$2,70 \times 10^6$ ($2,70 \times 10^6$)	$2,30 \times 10^6$ ($2,30 \times 10^6$)	$2,30 \times 10^6$ ($2,30 \times 10^6$)	$2,50 \times 10^6$ ($2,50 \times 10^6$)	$2,50 \times 10^6$ ($2,50 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$1,20 \times 10^5$ ($5,00 \times 10^6$)	$5,00 \times 10^4$ ($5,00 \times 10^6$)	$1,30 \times 10^5$ ($4,00 \times 10^6$)	$1,50 \times 10^5$ ($4,00 \times 10^6$)	$1,70 \times 10^5$ ($4,50 \times 10^6$)	$1,50 \times 10^5$ ($4,50 \times 10^6$)
<i>K. pneumoniae</i> 2948 S	0 (branco*)	$5,00 \times 10^6$ ($5,00 \times 10^6$)	$5,00 \times 10^6$ ($5,00 \times 10^6$)	$4,50 \times 10^6$ ($4,50 \times 10^6$)	$4,50 \times 10^6$ ($4,50 \times 10^6$)	$4,00 \times 10^6$ ($4,00 \times 10^6$)	$4,00 \times 10^6$ ($4,00 \times 10^6$)
	90 (branco*)	$1,90 \times 10^5$ ($9,00 \times 10^6$)	$5,00 \times 10^4$ ($9,00 \times 10^6$)	$3,30 \times 10^5$ ($8,00 \times 10^6$)	$1,80 \times 10^5$ ($8,00 \times 10^6$)	$1,90 \times 10^5$ ($7,00 \times 10^6$)	$1,70 \times 10^5$ ($7,00 \times 10^6$)

*Quantificação das bactérias no inóculo inicial e após os 90 minutos do ensaio de adsorção.

3.4. Ensaio de Interação entre as Matrizes e as Águas Residuais

As estirpes bacterianas presentes neste ensaio eram desconhecidas, permitindo assim realizar o ensaio em condições semelhantes às encontradas no meio ambiente natural.

Para além de diferentes estirpes bacterianas, as águas residuais possuem, vários compostos orgânicos e matéria orgânica natural que também podem ser adsorvidos pelo *biochar* e pelo carvão ativado o que poderá influenciar a adsorção das bactérias. Os compostos orgânicos ficam adsorvidos na porosidade do carvão ativado, no entanto, como as bactérias são maiores do que os poros do carvão ativado podem ser ainda adsorvidas à sua superfície. No caso da matéria orgânica natural, como é composta por moléculas maiores do que os poros do carvão, tal como as bactérias também vão ser adsorvidas à superfície o que poderá levar a que menos bactérias sejam adsorvidas à superfície do carvão ativado.

Tal como no ensaio com as estirpes bacterianas isoladas, foi avaliado em paralelo, o crescimento da bactéria também em meio de cultura aos 0 minutos (branco) e depois de incubação a 37 °C durante 90 minutos e com uma quantidade de 5mg e 15mg de cada uma das matrizes.

Para a realização do ensaio de interação entre as matrizes e as águas residuais, o inóculo utilizado foi retirado diretamente do frasco de colheita. Como as bactérias não estão em meio nutritivo, o crescimento observado no ensaio em branco (Água ETAR – representado a azul nas Figuras 37 a 39) não foi tão acentuado como nos ensaios com as estirpes bacterianas isoladas, que apresentavam a típica curva de crescimento bacteriano.

Como representado nos gráficos das Figuras 37 a 39, verificou-se uma diminuição das absorvâncias ao longo do tempo de ensaio em todas as matrizes utilizadas, o que significa que o número de bactérias presentes na água residual inicial diminuiu.

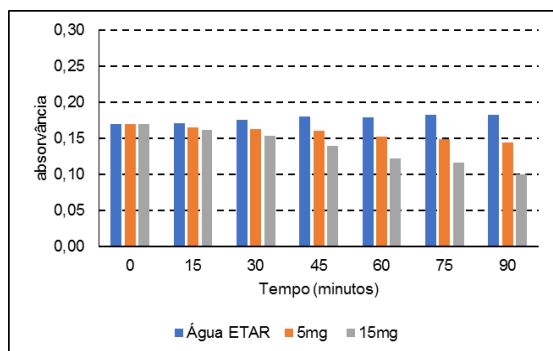


Figura 37 Absorbância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CS em 5 mL da Água de ETAR.

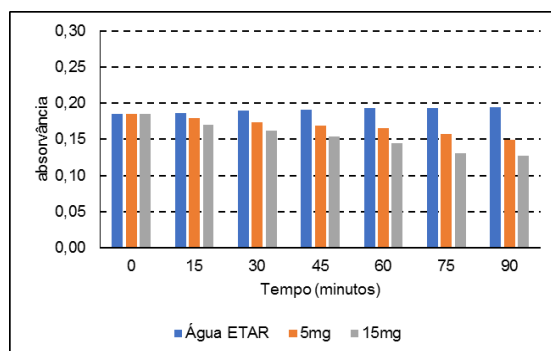


Figura 38 Absorbância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC <0,074 mm em 5 mL da Água de ETAR.

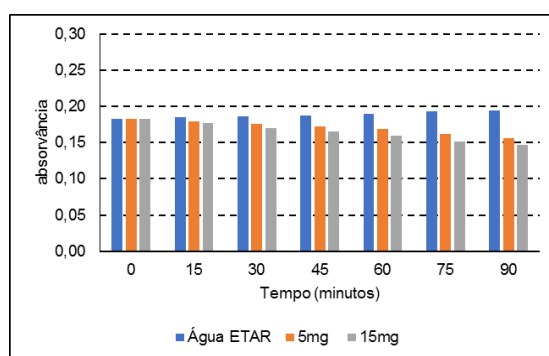


Figura 39 Absorbância das bactérias (comprimento de onda – 600nm) *versus* tempo de crescimento bacteriano e adsorção em 5 e 15 mg de amostra CC ≤0,149 mm em 5 mL da Água de ETAR.

Na Figura 40 estão representadas as percentagens de eficiência da remoção das bactérias presentes na água de ETAR ao fim dos 90 minutos de ensaio com 5 e 15 mg de cada uma das matrizes utilizadas.

Comparativamente com os ensaios de interação entre as matrizes e as estirpes bacterianas, nestes ensaios, não há uma diminuição tão acentuada das absorbâncias, logo menos bactérias terão sido adsorvidas à superfície da amostra. Em todas as matrizes utilizadas, as 15 mg apresentam uma maior remoção do número de bactérias, sendo que o *biochar* CS é o que apresenta uma maior percentagem de remoção das bactérias – 45%.

Verificou-se que em relação às bactérias estudadas isoladamente, a água de ETAR, levou a percentagens de eficiência de remoção das bactérias mais baixas.

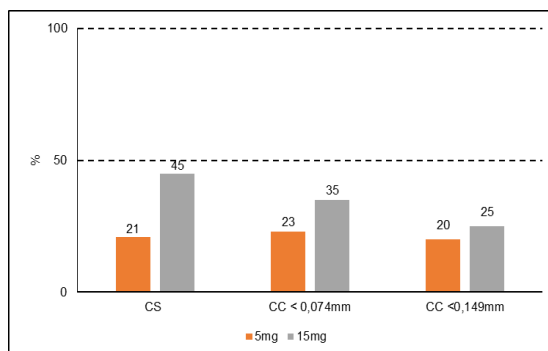


Figura 40 Percentagens de remoção das bactérias utilizadas nos ensaios de adsorção com 5mg e 15mg de amostra.

Na Tabela 4, estão representados os resultados obtidos através da quantificação de bactérias em meio de cultura, tal como na cinética de adsorção, verificou-se uma diminuição do número de bactérias na presença de qualquer uma das matrizes utilizadas. No entanto, tal como nos ensaios com as diferentes estirpes bacterianas, não se verifica uma grande variação entre as diferentes quantidades usadas de cada matriz.

Tabela 4. Quantificação das bactérias presentes na água de ETAR em meio de cultura sólido, no início (0min.) e no final (90min.) do ensaio de adsorção com as diferentes amostras. Os resultados estão apresentados em UFC/mL

Tempo (min.)	Amostra CS		Amostra CC <0,074mm		Amostra CC <0,149mm	
	5mg	15mg	5mg	15mg	5mg	15mg
0 (branco*)	$3,22 \times 10^6$ ($3,22 \times 10^6$)	$3,22 \times 10^6$ ($3,22 \times 10^6$)	$2,10 \times 10^6$ ($2,10 \times 10^6$)	$2,10 \times 10^6$ ($2,10 \times 10^6$)	$3,00 \times 10^6$ ($3,00 \times 10^6$)	$3,00 \times 10^6$ ($3,00 \times 10^6$)
90 (branco*)	$2,80 \times 10^5$ ($1,65 \times 10^6$)	$1,80 \times 10^5$ ($1,65 \times 10^6$)	$5,10 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^6$)	$6,00 \times 10^5$ ($1,00 \times 10^6$)	$4,00 \times 10^5$ ($1,40 \times 10^6$)	$2,00 \times 10^5$ ($1,40 \times 10^6$)

*Quantificação das bactérias no inóculo inicial e após os 90 minutos do ensaio de adsorção.

3.5. Ensaio de Detecção da Formação de Biofilmes

A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a situações de stresse ambiental são características fundamentais dos microrganismos. As bactérias existem em dois estados de vida básicos: como células planctónicas – células de vida livre – ou como células sésseis – os biofilmes.

De forma a tentar perceber, se as bactérias utilizadas nos ensaios de absorção estavam realmente a ficar adsorvidas à superfície das matrizes utilizadas, foram realizados, em paralelo, 2 ensaios diferentes de detecção de biofilmes.

3.5.1. Formação de Biofilmes nas Paredes dos Tubos

Em paralelo com o ensaio de adsorção das bactérias à superfície do *biochar* CS e do carvão CC <0,074mm, foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes nas paredes dos tubos Falcon, na *K. pneumoniae* 45, *K. pneumoniae* 703, *K. pneumoniae* 2948 R, *K. pneumoniae* 2948 S, *K. pneumoniae* 4889 e *P.aeruginosa*. Foram escolhidas estas estirpes para realizar o ensaio uma vez que são conhecidas por terem boa capacidade de formação de biofilmes⁵¹⁻⁵³.

Sabendo das propriedades de aderência de algumas bactérias, tornou-se importante perceber se estas possuíam uma maior afinidade de aderências às paredes dos tubos ou às matrizes utilizados nos ensaios.

Neste ensaio foi feito um controlo negativo – tubo vazio –, e um controlo positivo – tubo só com inóculo (branco).

Nas diferentes bactérias estudadas não se verificaram variações significativas de absorvância, tanto nas matrizes como nas diferentes quantidades de amostra utilizadas.

De todas as *K. pneumoniae* utilizadas neste ensaio, a que apresentou maior capacidade de aderência às paredes foi a *K. pneumoniae* 703 (Figura 41), sendo que a *K. pneumoniae* 2948, com resistência e sem resistência, foi a que apresentou uma menor capacidade de adsorção (Figura 42 e 43).

A capacidade aumentada de aderência às paredes por parte da *K. pneumoniae* 703 pode ser devido à ausência de cápsula que esta estirpe apresenta.

Por outro lado, o facto de a *K. pneumoniae* 2948 ter perdido o plasmídeo que lhe conferia resistência aos carbapenemos não parece ter influência na sua capacidade de aderência às paredes do tubo (Figuras 42 e 43).

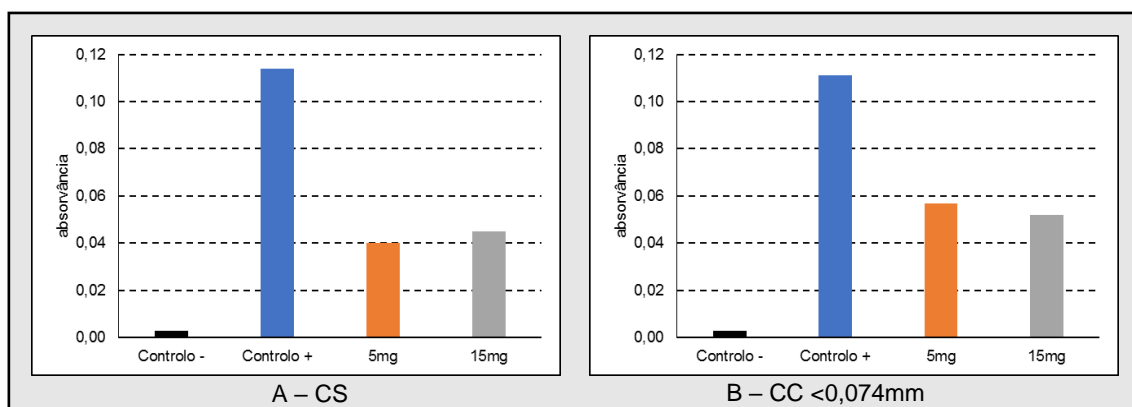


Figura 41 Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 703.

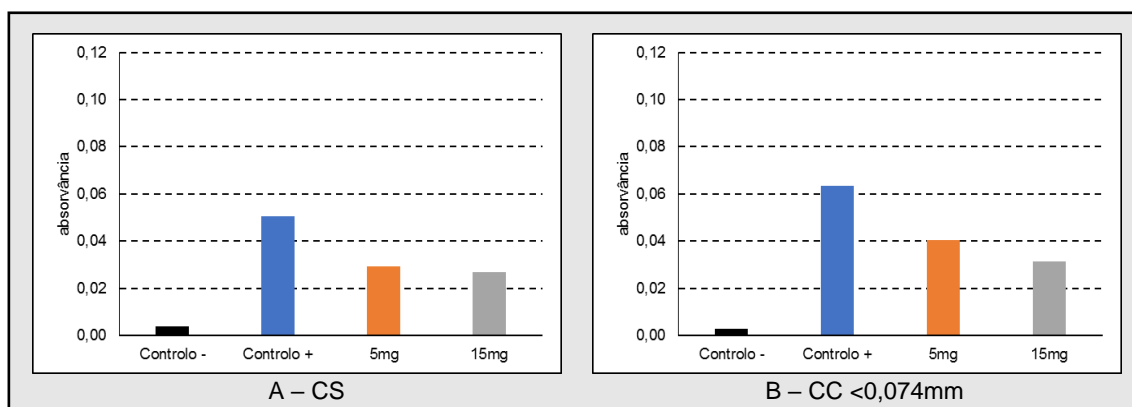


Figura 42 Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 2948 R.

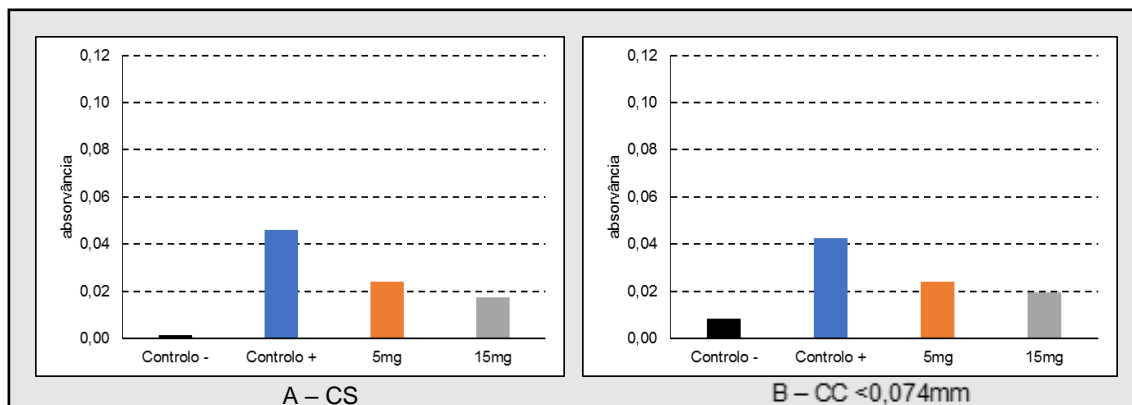


Figura 43 Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 2948 S.

A bactéria *P. aeruginosa* (Figura 44) também apresentou uma boa capacidade de formação de biofilmes, embora um pouco inferior à *K. pneumoniae* 703 (Figura 41).

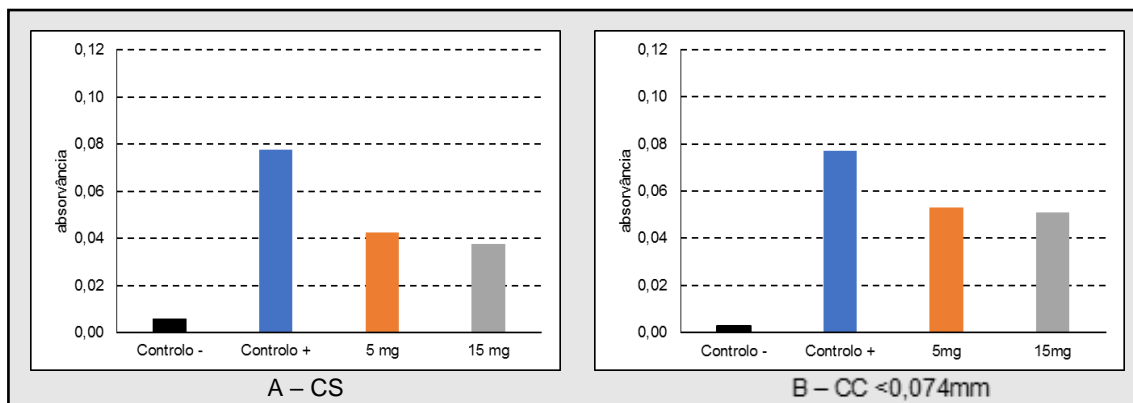


Figura 44 Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *P. aeruginosa* ATCC 23708.

Os resultados apresentados nas Figuras 45 e 46, demonstram que as estirpes *K. pneumoniae* 45 e 4889 apresentaram valores de absorvância intermédios entre a *K. pneumoniae* 703 e a 2948 ou seja, têm uma capacidade de formar biofilmes nas paredes dos tubos ligeiramente superior à *K. pneumoniae* 2948.

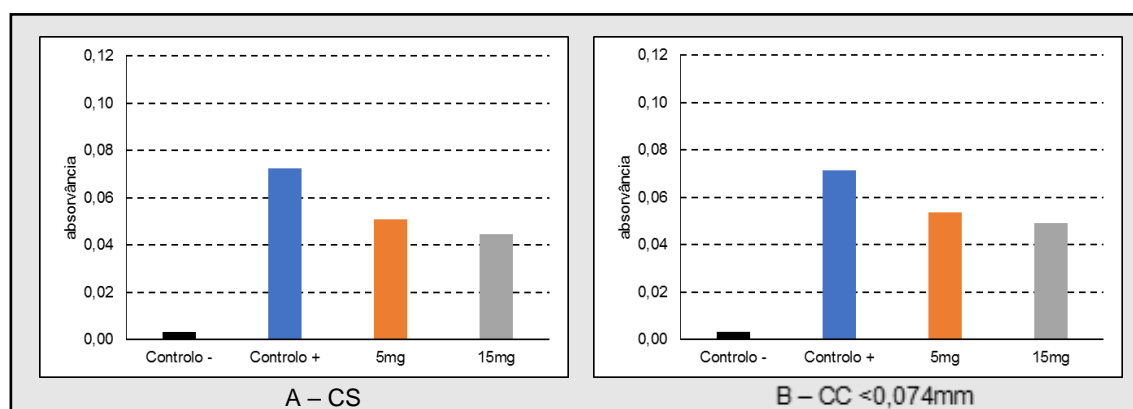


Figura 45 Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 45.

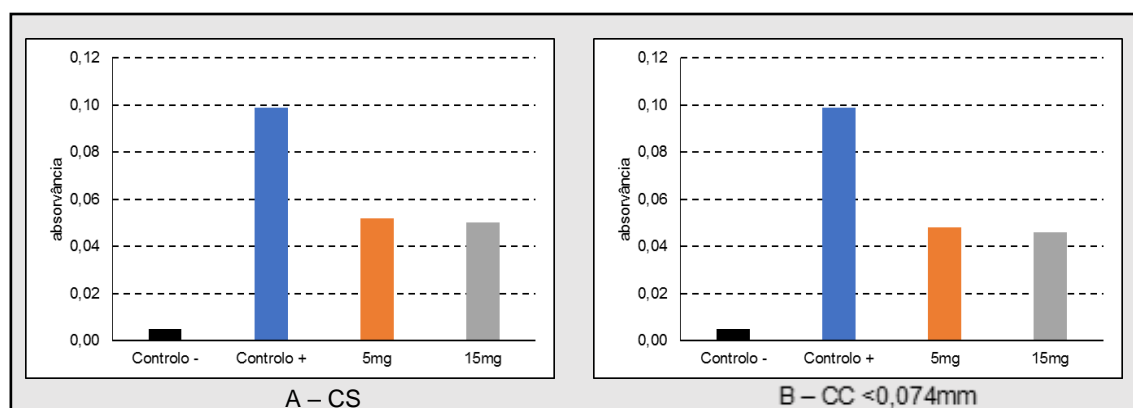


Figura 46 Ensaio de formação de biofilmes nas paredes dos tubos com *K. pneumoniae* 4889.

Neste ensaio, verificou-se que em cada uma das bactérias utilizadas, a absorvância foi maior no controlo positivo, o que significa que há uma maior quantidade de bactérias aderentes às paredes dos tubos que só contêm bactérias. Enquanto nos tubos que contêm as matrizes, a absorvância é menor logo há menos bactérias aderentes às paredes dos tubos o que leva a concluir que há de facto uma grande fração de bactérias que estão a ser adsorvidas na superfície das matrizes. Logo apesar das bactérias também formarem biofilmes nas paredes dos tubos utilizados, não impede a adsorção das bactérias à superfície das matrizes utilizadas.

3.5.2. Formação de Biofilmes nas Matrizes

Neste projeto, foi realizada SEM de modo a conseguir corroborar os resultados obtidos nos ensaios de adsorção. Uma vez que a SEM permite a obtenção de imagens com alta resolução torna-se mais fácil de verificar se as bactérias ficam ou não adsorvidas à superfície das matrizes. Com base nos resultados obtidos nos ensaios de interação entre as matrizes e as bactérias e nos resultados de aderência às paredes, as estirpes escolhidas para a realização deste ensaio foram a *K. pneumoniae* 703, a *K. pneumoniae* 2948 R e a *P. aeruginosa*.

Para este ensaio foram utilizadas 15 mg das amostras CS e CC <0,074mm. A maior diferença de adsorção de bactérias à superfície das matrizes, foi verificada na *K. pneumoniae* 2948 R em que o *biochar* CS adsorveu uma maior quantidade de bactérias do que o carvão CC, como se pode verificar na Figura 47.

No entanto no ensaio de aderência às paredes, esta foi a que apresentou uma menor capacidade de aderência às paredes. O que significa que a *K. pneumoniae* 2948 R tem uma maior afinidade com o *biochar* CS do que com o carvão CC <0,074 e com as paredes dos tubos de plástico utilizados durante os ensaios.

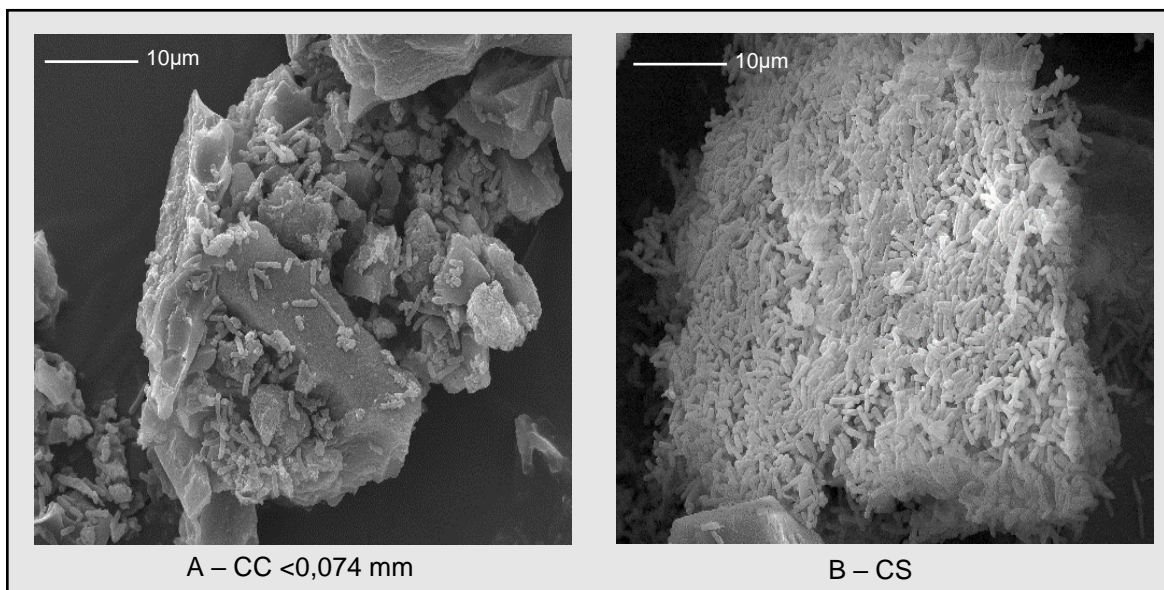


Figura 47 Microfotografia SEM da *K. pneumoniae* 2948 R adsorvida em duas matrizes, ampliação x2000.

No caso da *P.aeruginosa* (Figura 48) e da *K. pneumoniae* 703 (Figura 49), que apresentavam uma grande capacidade de aderência às paredes dos tubos de plástico, verificou-se uma menor aderência ao *biochar* CS comparativamente com a *K. pneumoniae* 2948 R. Contudo, para o carvão CC <0,074mm as 3 estirpes bacterianas utilizadas para este ensaio apresentam resultados bastante semelhantes entre si.

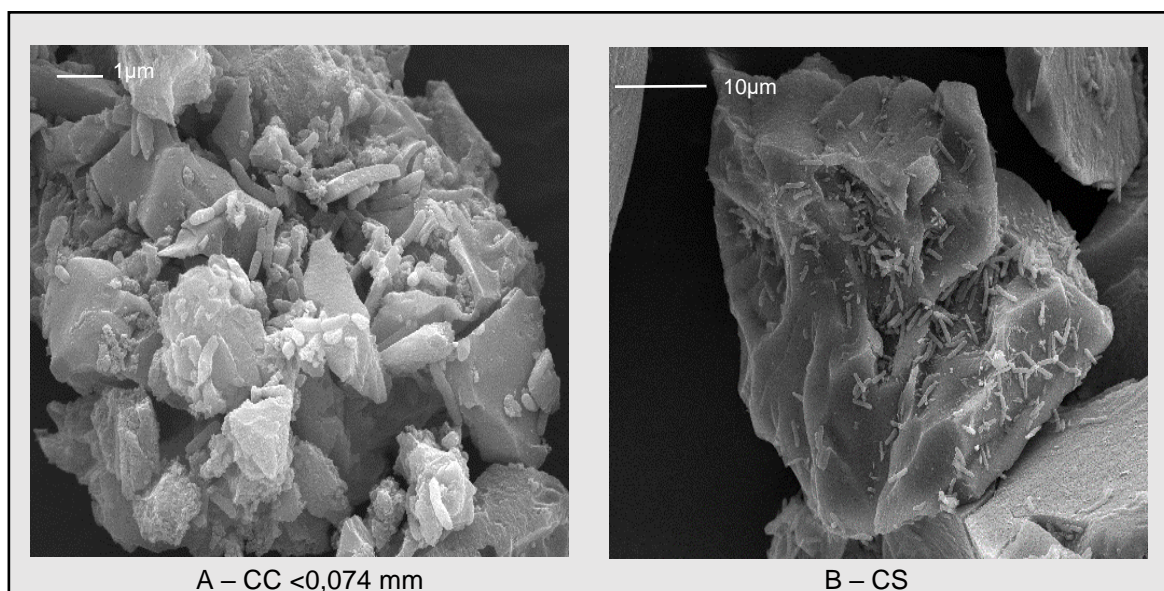


Figura 48 Microfotografia SEM da *P. aeruginosa* ATCC 23708 adsorvida em duas matrizes. A - ampliação x5000, B - ampliação x2000.

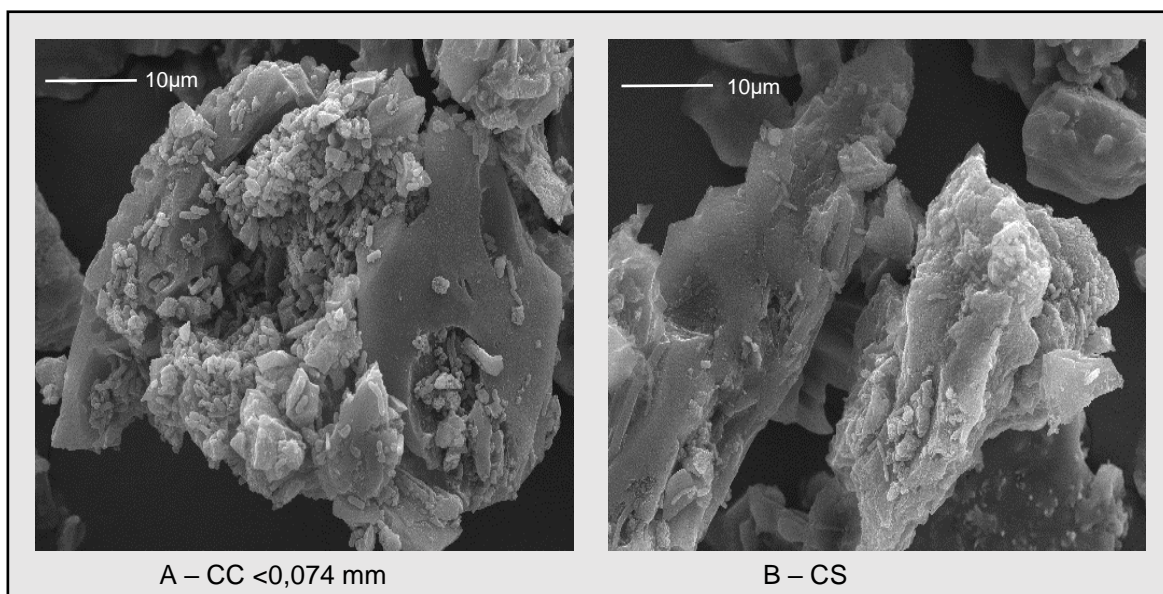


Figura 49 Microfotografia SEM da *K. pneumoniae* 703 adsorvida duas matrizes, com ampliação x2000.

Os resultados obtidos com esta metodologia, em conjunto com os resultados obtidos através da cinética de adsorção permitem concluir que qualquer uma das matrizes utilizadas neste projeto apresenta boa capacidade adsorção, logo, há remoção das diferentes estirpes bacterianas.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Os resultados reunidos no presente trabalho permitiram caracterizar a capacidade de diferentes estirpes bacterianas ficarem adsorvidas à superfície de diferentes matrizes.

Através dos resultados da cinética de adsorção, foi possível verificar uma diminuição significativa da absorvância das bactérias na presença das diferentes matrizes utilizadas, tanto nos ensaios com as estirpes bacterianas como nos ensaios com as águas residuais.

Tendo em conta as propriedades da superfície do *biochar* CS e do carvão CC, seria de esperar que a amostra CC tivesse um melhor desempenho, na remoção de bactérias. No entanto tal não se verificou, sendo que, no geral, o *biochar* CS foi o material que apresentou melhores resultados de remoção de bactérias nas várias estirpes estudadas.

Apesar de nas águas residuais, a remoção das bactérias ter sido consideravelmente inferior à observada nas restantes estirpes bacterianas, o *biochar* CS foi a matriz que obteve um melhor desempenho, o que mostra que este material poderá ser útil na purificação de águas residuais.

Pode concluir-se que a aparente perda do plasmídeo por parte da *K. pneumoniae* 2948 R não representou uma variação significativa na sua adsorção à superfície das matrizes. Em trabalhos futuros, seria relevante verificar se houve realmente a perda do plasmídeo por parte desta estirpe, através de extração de plasmídeos e PCR.

Nas imagens obtidas através do SEM foi possível verificar que as bactérias *K. pneumoniae* 2948 R, *K. pneumoniae* 703 e a *P. aeruginosa* aparentam ter uma maior afinidade para com o *biochar* CS do que com o carvão CC <0,074mm, sendo que na *K. pneumoniae* 2948 R é onde esta diferença é mais evidenciada. Sabendo que o *biochar* CS possui um pH_{pzc} de 2 e que nas condições em que foram realizados os

ensaios, a arga elétrica desta amostra era negativa, tal como a das bactérias estudadas, portanto, seria de esperar que fosse mais difícil a adsorção das bactérias a esta amostra, devido às forças de repulsão. Estes resultados permitem concluir que interação das bactérias com a superfície das matrizes não tem só um carácter eletrostático, poderá ter haver com o tipo de centros superficiais, que no caso do *biochar* CS são grupos sulfónicos.

Será então importante em trabalhos futuros estudar as diferentes propriedades da superfície do *biochar* CS de forma a perceber melhor a interação entre a sua superfície e as bactérias, de forma a poder melhorar o tratamento de águas residuais.

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFIA

5. Bibliografia

1. Djouadi LN, Selama O, Abderrahmani A, Bouanane-Darenfed A, Abdellaziz L, Amziane M, Fardeau ML, Nateche F, Multiresistant opportunistic pathogenic bacteria isolated from polluted rivers and first detection of nontuberculous mycobacteria in the Algerian aquatic environment, *Journal of Water and Health* (2009) 15 (4) 566-579.
2. Novo A, Andre S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM, Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.*, (2013) 47(5):1875-1887.
3. Udo EE, Al-Sweih N, 2017. Dominance of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a maternity hospital. *PLoS One.*;12(6):1-12.
4. Ferreira Da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM, Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol.* (2007) 60(1):166-176.
5. Martinez JL, Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut.* (2009)157(11):2893-2902.
6. Stewart MICH, Wolfe ROYL, Means EG, Assessment of the Bacteriological Activity Associated with Granular Activated Carbon Treatment of Drinking Water. (1990) 56(12):3822-3829.
7. Duoying Z, Weiguang LI, Shumei Z, Miao LIU, Xiaoyu Z, Xiancheng Z, Bacterial Community and Function of Biological Activated Carbon Filter in Drinking Water Treatment. *Biomed Environ Sci.*, (2011) 24(2):122-131.
8. Hijnen WAM, Suylen GMH, Bahlman JA, Brouwer-Hanzens A, Medema GJ, GAC adsorption filters as barriers for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water treatment. *Water Res.* (2010) 44(4):1224 - 1234.
9. Rivera-Utrilla J, Bautista-Toledo I, Ferro-García MA, & Moreno-Castilla C, Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption, (2001) 1209 - 1215.
10. Woolf D, Amonette JE, Street-Perrot FA, Lehmann J, Joseph S, Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nat. Commun.* 1 (2010), 56.

11. Ahmad L., Rajapak sha, AU, Lim,JE, Zhang M, Bolan N, Mohan D, Vithanage M, Lee SS, Ok, YS, Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere* 99 (2014), 19 - 33.

12. Mui ELK, Cheung WH, Valix M, McKay G. Dye adsorption onto char from bamboo. *J Hazard Mater.*; (2010) 177(1-3):1001-1005.
13. Bandoz T. J., *Activated Carbon Surfaces in Environmental Remediation*, 1ª Edição, Vol. 7, Elsevier (2006) pp 1-45, 159-217, 345-369.
14. Mestre AS, Tyszko E, Andrade MA, Galhetas M, Freire C, Carvalho AP, Sustainable activated carbons prepared from a sucrose-derived hydrochar: remarkable adsorbents for pharmaceutical compounds. *RSC Adv.*; (2015) 5(25):19696-19707.
15. Huggins TM, Haeger A, Biffinger JC, Ren ZJ, Granular biochar compared with activated carbon for wastewater treatment and resource recovery. *Water Res*; 2016 94:225-232.
16. Harmer MA, Fan A, Liauw A, Kumar RK. A new route to high yield sugars from biomass: phosphoric-sulfuric acid. *Chemical Communications*. 2009(43):6610-6612.
17. Wang L, Guo Y, Zou B, Rong C, Ma X, Qu Y, Li Y, Wang Z. High surface area porous carbons prepared from hydrochars by phosphoric acid activation. *Bioresource Technology*. 2011; **102**(2):1947-1950.
18. Wang L, Guo Y, Zhu Y, Li Y, Qu Y, Rong C, Ma X, Wang Z. A new route for preparation of hydrochars from rice husk. *Bioresource Technology*. 2010; **101**(24):9807-9810.
19. Busscher HJ, Dijkstra RJB, Langworthy DE, Collias DI, Bjorkquist DW, Mitchell MD, Van der Mei HC. et al. Interaction forces between waterborne bacteria and activated carbon particles. *J Colloid Interface Sci*. 2008;322(1):351-357.
20. Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ, Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23 1999 179-229.
21. Jucker BA, Harms H, Zehnder AB, Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J. Bacteriol.*, 178, 1996, 5472-5479.
22. Gottenbos B, Grijpma DW, Van der Mei HC, Feijen J, Busscher HJ, Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria *J. Antimicrob. Chemother.* 48 2001, 7-13.

- 23.** Barroso H, Meliço-Silvestre A, Taveira N, 2014. *Microbiologia Médica*, 1ª Ed., Vol. 1. Lisboa: LIDEL, 2014, pp 7-9, 210-227, 230-232, 250-252, 343-349
- 24.** Mara D, Horan N, 2003. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Elsevier, 2003, pp 193-199, 263-271, 333-342.
- 25.** Águas de Portugal - <http://www.adp.pt/pt/atividade/o-que-fazemos/o-ciclo-urbano-da-agua/?id=28>, Consultado em: 8 de outubro de 2016.
- 26.** Aizenchtadt E, Ingman D, Friedler E, Quality control of wastewater treatment: A new approach; 2008, 189:445-458.
- 27.** Lüddecke F, He S, Gallert C, Winter J, Güde H, Löffler H, Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Res.*; 2015, 69:243-251.
- 28.** Caderno DGIES n.º5 – Recomendações Genéricas para a Gestão de Águas Residuais Hospitalares, 2005 - <http://www.acss.min-saude.pt/2016/10/04/cadernos-dgies/>.
- 29.** Dodd MC, Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J Environ Monit.*, 2012, 14(7):1754.
- 30.** Hu QY, Li M, Wang C, Ji M, Influence of powdered activated carbon addition on water quality, sludge properties, and microbial characteristics in the biological treatment of commingled industrial wastewater. *J Hazard Mater.*, 2015, 295:1-8
- 31.** Alanis AJ, Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* 36, 2005, 697 –705.
- 32.** Andersson DI, Hughes D, Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev.*; 35, 2011, (5):901-911.
- 33.** Davison J, Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42, 1999 73-91.
- 34.** Barkay T, Kroer N, Rasmussen LD, Sorensen S, Conjugal gene transfer at natural population densities in a microcosmos simulating an estuarine environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 1995, 43-54.
- 35.** Muela A, Pocino I, Arana J, Justo J, Iriberry J, Barcina J, Effects of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1994, 4273-4278.

- 36.** Alonso A, Sánchez P, Martínez JL, Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 3, 2001, 1–9.

37. Martinez JL, Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 321, 2008, 365–367.
38. Aminov RI, The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* (2009) 11(12):2970-2988.
39. Kummerer K, Antibiotics in the aquatic environment e a review Part II. *Chemosphere*, 2009, 75: 435-441.
40. Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol.*, 2003, 43: 325-335.
41. Volkmann H, Schwart T, Bischoff P, Kirchen S, Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using realtime PCR (TaqMan). *J. Microbiol.Methods*, 2004, 56: 277–286.
42. Heuer H, Focks A, Lamshöft M, Smalla K, Matthies M, Spiteller M, Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, 40: 1892–1900.
43. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P, Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland, *Vet. Microbiol.*, 2003, 91: 73–84.
44. Perreten V, Boerlin P, A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2003, 47(3):1169-1172.
45. Baquero F, Martínez JL, Cantón R, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2008, 19: 260 –265.
46. Novo A, Manaia CM, Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2010, 87(3):1157-1166.
47. Manzetti S, Ghisi R, The environmental release and fate of antibiotics. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 2014, 7 –15.
48. Kim S, Aga DS, Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 2007, 10 (8): 559-573.

49. Segura PA, François M, Gagnon C, Sauvé S, Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environ Health Perspect.*, 2009, 117(5):675-684.
50. Zhao JL, Liu YS, Liu WR, Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environ. Pollut.*, 2014, 198: 15 –24.
51. Tello A, Austin B, Telfer TC, Selective pressure of antibiotic pollution, 2012, (8):1100-1106.
52. Carvalho IT, Santos L, Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ Int.*, 2016, 94:736-757.
53. Czekalski N, Berthold T, Caucci S, Egli A, Bürgmann H, Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Front Microbiol.*, 2012, 3:1-18.
54. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT, A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*, 2004, 199: 697-705.
55. Podschun R, Ullmann U, *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11: 589-603.
56. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd T, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie JT: bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41:435-464.
57. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell D, Korber D, Lappin-Scott HM, Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49:711-745.
58. Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP, Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 2001, 413:860-864.
59. Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera BA, Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol*, 2003, 185:1951-1957.
60. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2017. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, March 13, 2017.
61. Sutton S, Measurement of microbial cells by optical density. *J Valid Techn.*, 2011, 17(1):46-49.

- 62.** Naka K, Watarai S, Tana, Inoue K, Kodama Y, Oguma K, Yasuda T, Kodama H, Adsorption effect of activated charcoal on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Veter. Med. Science*. 63, 2000, 281-285.
- 63.** Mestre AS, Marques SCR, Carvalho AP, Effect of cosolvent in the removal of caffeine by activated carbons, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 2012, 9850-9857.
- 64.** Barreiros T, Resultados não publicados.
- 65.** Bennett PM, Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.*, 2009, 153(S1): S347-S357.

ANEXOS

ANEXO 1. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.2.

E. coli ATCC 25922

Tempo	c/ centrifugação	s/ centrifugação
0	0,076	0,083
45	0,197	0,209
90	0,29	0,300

Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>E. coli</i>	5mg	15mg
0	0,173	0,173	0,173
15	0,196	0,142	0,109
30	0,212	0,124	0,083
45	0,253	0,136	0,090
60	0,280	0,116	0,033
75	0,288	0,105	0,029
90	0,300	0,082	0,028

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>E. coli</i>	5mg	15mg
0	0,081	0,081	0,081
15	0,083	0,074	0,074
30	0,098	0,072	0,070
45	0,128	0,065	0,028
60	0,154	0,061	0,019
75	0,200	0,046	0,015
90	0,238	0,035	0,012

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>E. coli</i>	5mg	15mg
0	0,083	0,079	0,076
15	0,116	0,076	0,070
30	0,179	0,070	0,064
45	0,209	0,060	0,050
60	0,286	0,054	0,041
75	0,313	0,027	0,037
90	0,307	0,021	0,019

S. aureus 106414Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>S. aureus</i>	5mg	15mg
0	0,075	0,075	0,075
15	0,093	0,071	0,073
30	0,100	0,064	0,061
45	0,107	0,058	0,051
60	0,119	0,055	0,046
75	0,127	0,029	0,024
90	0,153	0,020	0,017

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>S.aureus</i>	5mg	15mg
0	0,140	0,140	0,140
15	0,146	0,134	0,122
30	0,171	0,128	0,114
45	0,193	0,100	0,085
60	0,228	0,087	0,076
75	0,234	0,081	0,064
90	0,247	0,074	0,059

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>S.aureus</i>	5mg	15mg
0	0,132	0,132	0,132
15	0,162	0,128	0,128
30	0,188	0,126	0,126
45	0,193	0,119	0,122
60	0,212	0,075	0,090
75	0,234	0,069	0,084
90	0,252	0,056	0,059

***P. aeruginosa* ATCC 23708**Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>P. aeruginosa</i>	5mg	15mg
0	0,091	0,091	0,091
15	0,095	0,087	0,084
30	0,100	0,084	0,079
45	0,109	0,080	0,074
60	0,121	0,079	0,069
75	0,131	0,074	0,054
90	0,140	0,070	0,050

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>P. aeruginosa</i>	5 mg	15 mg
0	0,120	0,120	0,120
15	0,127	0,117	0,114
30	0,136	0,099	0,101
45	0,144	0,094	0,090
60	0,158	0,087	0,083
75	0,172	0,081	0,076
90	0,181	0,076	0,071

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>P. aeruginosa</i>	5mg	15mg
0	0,102	0,102	0,102
15	0,109	0,100	0,098
30	0,131	0,098	0,093
45	0,146	0,094	0,091
60	0,155	0,091	0,086
75	0,168	0,082	0,080
90	0,178	0,079	0,071

K. pneumoniae 4889Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>K. pneumoniae 4889</i>	5mg	15mg
0	0,195	0,195	0,195
15	0,223	0,211	0,201
30	0,247	0,193	0,173
45	0,262	0,140	0,130
60	0,267	0,093	0,140
75	0,273	0,077	0,095
90	0,286	0,075	0,072

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae 4889</i>	5mg	15mg
0	0,123	0,123	0,123
15	0,189	0,110	0,117
30	0,202	0,099	0,109
45	0,210	0,091	0,097
60	0,217	0,175	0,165
75	0,226	0,183	0,180
90	0,240	0,134	0,152

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm

Tempo	<i>K. pneumoniae 4889</i>	5mg	15mg
0	0,200	0,200	0,200
15	0,226	0,173	0,182
30	0,282	0,166	0,174
45	0,329	0,120	0,149
60	0,365	0,109	0,123
75	0,382	0,122	0,126
90	0,422	0,115	0,118

:

***K. pneumoniae* 45**Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 45	5mg	15mg
0	0,114	0,114	0,114
15	0,120	0,111	0,108
30	0,125	0,103	0,098
45	0,137	0,077	0,066
60	0,155	0,072	0,061
75	0,169	0,063	0,054
90	0,197	0,049	0,036

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 45	5mg	15mg
0	0,123	0,123	0,123
15	0,152	0,108	0,105
30	0,168	0,079	0,078
45	0,177	0,077	0,075
60	0,186	0,068	0,061
75	0,194	0,069	0,056
90	0,243	0,062	0,051

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 45	5mg	15mg
0	0,131	0,131	0,131
15	0,150	0,120	0,113
30	0,169	0,113	0,103
45	0,180	0,102	0,093
60	0,191	0,094	0,086
75	0,196	0,082	0,080
90	0,213	0,076	0,071

***K. pneumoniae* 703**Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 703	5mg	15mg
0	0,120	0,120	0,120
15	0,123	0,105	0,108
30	0,127	0,097	0,095
45	0,138	0,092	0,082
60	0,154	0,093	0,081
75	0,183	0,075	0,056
90	0,208	0,058	0,034

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 703	5mg	15mg
0	0,190	0,190	0,190
15	0,229	0,127	0,109
30	0,234	0,111	0,091
45	0,240	0,099	0,083
60	0,260	0,084	0,076
75	0,274	0,080	0,069
90	0,280	0,072	0,059

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 703	5mg	15mg
0	0,203	0,203	0,203
15	0,213	0,179	0,165
30	0,222	0,152	0,140
45	0,230	0,136	0,111
60	0,240	0,129	0,103
75	0,253	0,114	0,091
90	0,266	0,101	0,084

ANEXO 2. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.3.

K. pneumoniae 2948 R

Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 2948 R	5 mg	15 mg
0	0,127	0,127	0,127
15	0,135	0,121	0,119
30	0,160	0,117	0,113
45	0,170	0,102	0,098
60	0,176	0,093	0,088
75	0,182	0,083	0,081
90	0,187	0,078	0,073

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 2948 R	5mg	15mg
0	0,092	0,092	0,092
15	0,099	0,090	0,087
30	0,104	0,087	0,084
45	0,115	0,084	0,081
60	0,125	0,081	0,073
75	0,143	0,076	0,069
90	0,156	0,067	0,061

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 2948 R	5mg	15mg
0	0,102	0,102	0,102
15	0,110	0,101	0,100
30	0,120	0,096	0,094
45	0,128	0,090	0,085
60	0,135	0,131	0,127
75	0,164	0,121	0,110
90	0,185	0,102	0,088

***K. pneumoniae* 2948 S**Ensaio com a amostra CS:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 2948 S	5mg	15mg
0	0,110	0,110	0,110
15	0,126	0,099	0,092
30	0,132	0,088	0,079
45	0,140	0,080	0,068
60	0,149	0,071	0,061
75	0,160	0,064	0,054
90	0,169	0,061	0,051

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 2948 S	5mg	15mg
0	0,120	0,120	0,120
15	0,132	0,117	0,115
30	0,150	0,114	0,110
45	0,158	0,107	0,100
60	0,166	0,101	0,091
75	0,174	0,094	0,082
90	0,184	0,089	0,073

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	<i>K. pneumoniae</i> 2948 S	5mg	15mg
0	0,123	0,123	0,123
15	0,136	0,119	0,115
30	0,146	0,110	0,102
45	0,160	0,100	0,094
60	0,170	0,094	0,085
75	0,179	0,089	0,081
90	0,190	0,085	0,079

ANEXO 3. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.4.

Ensaio com a amostra CS:

Tempo	Água ETAR	5mg	15mg
0	0,170	0,170	0,170
15	0,171	0,165	0,161
30	0,175	0,163	0,153
45	0,180	0,160	0,139
60	0,179	0,152	0,122
75	0,182	0,149	0,116
90	0,182	0,144	0,100

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Tempo	Água ETAR	5mg	15mg
0	0,186	0,186	0,186
15	0,187	0,179	0,171
30	0,190	0,174	0,163
45	0,192	0,170	0,155
60	0,193	0,166	0,145
75	0,194	0,158	0,131
90	0,195	0,149	0,127

Ensaio com a amostra CC ≤0,149mm:

Tempo	Água ETAR	5mg	15mg
0	0,183	0,183	0,183
15	0,185	0,180	0,177
30	0,186	0,176	0,171
45	0,188	0,173	0,165
60	0,190	0,169	0,160
75	0,194	0,163	0,152
90	0,195	0,156	0,147

ANEXO 4. Tabelas com os valores correspondentes aos gráficos apresentados no capítulo 3.5.1.

K pneumoniae 703

Ensaio com a amostra CS:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,003
Controlo +	0,114
5mg	0,040
15mg	0,045

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,003
Controlo +	0,111
5mg	0,057
15mg	0,052

K pneumoniae 2948 R

Ensaio com a amostra CS:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,004
Controlo +	0,051
5mg	0,030
15mg	0,027

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,003
Controlo +	0,064
5mg	0,041
15mg	0,032

***K pneumoniae* 2948 S**Ensaio com a amostra CS:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,002
Controlo +	0,046
5mg	0,024
15mg	0,018

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,009
Controlo +	0,043
5mg	0,024
15mg	0,020

***P. aeruginosa* ATCC 23708**Ensaio com a amostra CS:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,006
Controlo +	0,078
5 mg	0,043
15 mg	0,038

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,003
Controlo +	0,077
5mg	0,053
15mg	0,051

***K pneumoniae* 45**

Ensaio com a amostra CS:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,003
Controlo +	0,073
5mg	0,051
15mg	0,045

Ensaio com a amostra CC <0,074mm:

Aderência às paredes	
Controlo -	0,003
Controlo +	0,072
5mg	0,054
15mg	0,049